

# **Neuroprotekció vizsgálata trauma és stroke modellen**

**Ph.D. értekezés**

**Rákos Gabriella**

Témavezető:  
**Dr. Kis Zsolt**  
egyetemi adjunktus

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK

Szeged

2010

# Tartalomjegyzék

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>2. BEVEZETÉS .....</b>	<b>6</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>8</b>
3.1 KEZELÉSI ELVEK.....	16
3.1.1 NOS-gátlók.....	18
3.1.2 Antiapoptotikus terápiás stratégiák.....	18
3.1.3 Feszültségfüggő $Ca^{2+}$ -csatorna antagonisták.....	19
3.1.4 Neurotrofinok .....	19
3.1.5 Neuroszteroidok.....	19
3.1.6 Excitatorikus aminosav-antagonisták.....	21
<b>4. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>26</b>
4.1 TRAUMA MODELL .....	26
4.1.1 Evans Blue és TTC festés alkalmazása hideg léziós modellen .....	26
4.1.2 DHEAS elő- és utókezelés hatásának vizsgálata.....	26
4.2 STROKE MODELL .....	26
4.2.1 Glutamát scavenger oxálecetsav neuroprotektív hatásának vizsgálata.....	26
<b>5. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>27</b>
5.1 TRAUMA MODELL .....	27
5.1.1 TTC festés.....	27
5.1.2 Evans Blue festés.....	28
5.1.3 NeuN festés.....	29
5.1.4 Fluoro-Jade B festés.....	30
5.1.5 DHEAS és $E_2$ - kezelés.....	30
5.1.6 Statisztikai analízis.....	31
5.2 STROKE MODELL .....	31
5.2.1 Statisztikai analízis.....	32
<b>6. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>33</b>
6.1 TRAUMA MODELL .....	33
6.1.1 Evans Blue- és TTC-festés.....	33
6.1.2 NeuN és Fluoro-Jade B kettős festés.....	37
6.1.3 DHEAS- és $E_2$ kezelés hatása .....	38
6.2 STROKE MODELL .....	41
6.2.1 Oxálecetsav hatása fototrombotikus lézióban.....	41
<b>7. DISZKUSSZIÓ .....</b>	<b>45</b>
<b>8. KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>52</b>
8.1 TRAUMA MODELL .....	52
8.2 STROKE MODELL .....	52
<b>9. ÖSSZEFOGLALÓ .....</b>	<b>53</b>

<b>10.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>56</b>
<b>11.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>58</b>
<b>12.</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>59</b>
<b>13.</b>	<b>TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....</b>	<b>80</b>
<b>14.</b>	<b>ABSZTRAKTOK.....</b>	<b>82</b>

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**17 $\beta$ -HSD:** 17 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz

**3 $\beta$ -HSD:** 3 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz-izomeráz

**AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4 izoxalon propionsav

**BDNF:** agyi eredetű növekedési faktor (brain-derived neurotrophic factor)

**DHEA:** dehidroepiandroszteron

**DHEAS:** dehidroepiandroszteron-szulfát

**E<sub>2</sub>:** 17 $\beta$ -ösztadiol

**EB:** Evans Kék (Evans Blue)

**Fas-L:** Fas-ligand

**FJB:** Fluoro Jade B

**GABA:** gamma-aminovajsav (gamma-aminobutyric acid)

**Glu:** glutamát

**GOT:** glutamát-oxálacetát-transzamináz

**GPT:** glutamát-pyruvát-transzamináz

**MAP2:** mikrotubulus-asszociált protein-2

**Mkp-1:** mitogén aktivált protein kináz-foszfataz-1

**NF $\kappa$ B:** Nuclear factor- kappaB

**NGF:** idegnövekedési faktor (nerve growth factor)

**NMDA:** N-metil-D-aszpartát

**NO:** nitrogén-monoxid

**NOS:** nitrogén-monoxid szintetáz

**eNOS:** endotheliális nitrogén-monoxid szintetáz

**iNOS:** indukálható nitrogén-monoxid szintetáz

**nNOS:** neuronális nitrogén-monoxid szintetáz

**OxAc:** oxálecetsav

**P450scc:** cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzim

**PLA<sub>2</sub>:** foszfolipáz-A<sub>2</sub>

**PREG:** pregnenolon

**Pyr:** pyruvát

**SOD:** szuperoxid-dizmutáz

**THDOC:** allotetrahidrodeoxikortikoszteron

**THP:** allopregnanolon ( $3\alpha$ ,  $5\alpha$ -tetrahydroprogesterone)

**TNF $\alpha$ :** tumor nekrosis faktor- $\alpha$

**TTC:** 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid

## 2. BEVEZETÉS

Az idegrendszeri megbetegedések hátterében sokféle károsító tényező állhat és ennek következtében a neurológiai kórképek nagyon változatosak. Eredetüket tekintve megkülönböztethetők a traumás-, vasculáris- (pl. stroke), gyulladásos- (pl. encephalitis), autoimmun- (pl. sclerosis multiplex), degeneratív- (pl. Alzheimer-kór) és daganatos (pl. glioma) idegrendszeri betegségek.

Néhány évtizeddel ezelőtt még általános volt az a nézet, mely szerint a súlyos idegrendszeri károsodások –eredetüktől függetlenül- visszafordíthatatlan funkcionális, illetve struktúrális elváltozásokkal járnak. A klinikai tapasztalatok azt mutatják, hogy a tünetek és ezzel együtt az agyi károsodást szenvedett betegek állapota az idő előrehaladtával rosszabbodik. Az elmúlt években végzett kutatások eredményei szolgáltatták a magyarázatot a progresszió jelenségére. Ismertté vált például, hogy traumás agyi sérülések vagy stroke esetén az elsődleges károsodást másodlagos károsodások követik, melyek megelőzésével számottevően csökkenthető a halálozási arány és a maradandó károsodások kialakulása. Ez a felismerés új irányvonalat adott a terápiás elveknek és az alkalmazott protokolloknak.

Kutatásaink középpontjában a traumás agyi sérülések, illetve az ischemiás agyi károsodások hátterében álló és azokat kísérő patofiziológiai tényezők állnak. Kísérleteink során egy széles körben elfogadott trauma- és stroke modellt alkalmaztunk.

Témaválasztásunkat az indokolta, hogy a neurológiai kórképek közül a stroke a leggyakrabban előforduló akut megbetegedés és a harmadik leggyakoribb halálok. A legfrissebb hazai felmérésekből kiderül, hogy a stroke okozta halálozás csökkenő tendenciát mutatott az elmúlt években, ennek ellenére a stroke előfordulási gyakorisága a legtöbb korcsoportban még mindig 1,5-2-szerese a fejlett nyugat-európai országokhoz képest (Vokó 2008). Azt sem szabad figyelmen kívül hagynunk, hogy a várható élettartam kitolódásával a stroke gyakorisága és egyben mortalitása is növekszik. A magasabb életkorral ugyanis a stroke szempontjából rizikótényezőt jelentő betegségek (pl. ischaemiás szívbetegség, hypertonia, pitvarfibrilláció) előfordulása is nő (Pozsgovits és mtsai., 2006). A stroke-ot túlélte betegek jelentős hányada életvitelében korlátozottá, akár önellátásra képtelenné válik, mely nem csak a betegségben szenvedőre, hanem a szűkebb és tágabb környezetére, a társadalomra is súlyos terheket ró.

Az agyi vaszkuláris katasztrófák mellett az agyi traumás sérülések a maradandó agykárosodás kialakulásának leggyakoribb okai. A traumás eredetű agysérülések a fejlett,

motorizált országokban évről évre egyre nagyobb számban fordulnak elő. A WHO előrejelzése szerint 2020-ra elsősorban a közúti balesetekből származó sérülések jelentik majd a harmadik legsúlyosabb egészségügyi problémát (Murray és Lopez 1997). A baleseti halálozások közel fele hozható kapcsolatba koponya-, illetve agysérüléssel. Egy 2002-es tanulmány felmérése szerint a koponya – agysérülést szenvedett betegek mortalitása 45%. Ezen betegek kisebb hányadánál már az elsődleges károsodás végzetes kimenetelű volt. A közepesen súlyos, illetve enyhe agysérülést szenvedett betegek halálozása is elérte a 35%-ot. A balesetek döntően a 40 év alatti korosztályt érintik, gyermekkorban pedig egyértelműen ez a vezető halálok (Magyar Idegsebészeti Társaság programtervezete, 2003). A traumás agysérülések azonban az idős embereket is fenyegetik az egyensúlyérzékelés és mozgáskoordinációs képesség csökkenése miatt bekövetkező balesetekből adódóan.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A klinikumból jól ismert, hogy a központi idegrendszert érő inzultusok különböző mértékű károsodásokat idézhetnek elő az idegszövetben, melyek igen eltérő következményekkel járnak. A károsodás súlyossága az enyhe, átmeneti funkcionális zavaroktól kezdve egészen a tartós rokkantságig vagy akár az érintett egyén haláláig terjedhet. A klinikai tapasztalatok azt mutatják, hogy az idegrendszert érintő kórképek tünetei az esetek nagy részében- a tüneti kép kialakulását követően órákkal, napokkal később- romlanak. A progresszió hátterében több, egymással összefüggő, illetve egymást kísérő patofiziológiai jelenség áll. Ezeknek a tényezőknek és folyamatoknak a feltárása, ismerete alapvetően szükséges a neuroprotektív terápiák megtervezéséhez, hiszen minden terápiás próbálkozás végső célja az idegsejt-károsodás mértékének és a kiesési tünetek súlyosságának mérséklése, valamint a túlélés javítása.

Kutatásaink során az idegrendszeri károsodások két típusát vizsgáltuk: a traumás agyi sérüléseket az ún. hideg léziós modellen, míg a cerebrovascularis kórképek közé sorolható stroke-ot az ún. fototrombotikus modellen tanulmányoztuk.

A különböző eredetű agyszövet károsodásokban szerepet játszó folyamatoknak vannak közös elemei. Egyik fontos tényező, hogy minden esetben el lehet különíteni az inzultust közvetlenül követő elsődleges és a később kialakuló másodlagos károsodásokat (Werner és Engelhard 2007). Az elsődleges károsodás az érintett agyi régió szövetállományának közvetlen pusztulásában nyilvánul meg. Trauma esetében ezt előidézheti az agyat ért mechanikai behatás vagy a modellünkben alkalmazott, az agyhoz érintett, erőteljesen lehűtött termód. Ischaemiás stroke-ban egy intracraniális artéria hirtelen elzáródása okozza az idegszövet elhalását. A másodlagos károsodások a primer behatás után percekkel, órákkal, akár napokkal később létrejövő, meglehetősen bonyolult kórélettani folyamatok, melyek magukba foglalják az idegsejtek késleltett pusztulását, az O<sub>2</sub>-szabad gyökök felszabadulását, az acidosist, vér-agy gát permeabilitásának fokozódását stb. (Hovda és mtsai., 1992; Murakami és mtsai., 1999; Saito és mtsai., 2005).

Kiemelkedő jelentősége van, hogy a legtöbb központi idegrendszeri rendellenesség és sérülés közvetlen vagy közvetett következménye, az átmeneti vagy tartós vérrellátási zavar (Werner és Engelhard 2007).



Régóta ismert az a tény, hogy az idegsejtek a nagy energiaigényüket csak direkt energiaforrásként alkalmazható szubsztrátok felhasználásával képesek kielégíteni. A legfontosabb szubsztrátjuk a glükóz, az agyszövet glükóz igénye 4,5-5,5 mg/100 g szövet/ perc. A felhasznált energia biztosítása oxidatív foszforilációval történik. Az emberi agy globális nyugalmi O<sub>2</sub>-felhasználása 3,5-5,5 ml/ 100 g szövet/ perc. Az agy egyes területeinek O<sub>2</sub>-igénye nagyon eltérő lehet, mely magyarázatot szolgáltat arra a jelenségre, hogy az O<sub>2</sub>-hiány az egyes agyi régiókban miért okoz különböző mértékű károsodásokat. Az agykéreg már 5-7 perces O<sub>2</sub>-hiány következtében súlyosan károsodhat, míg az agytörzs ennél hosszabb ideig tartó hiány esetében is ép maradhat. Ischaemiás behatásra legérzékenyebb agyi struktúrák a bazális ganglionok, a hippocampus (CA1 régió), a kisagy és a neocortex sejtjei (Pulsinelli és mtsai., 1982). Mivel az agyban a működéshez szükséges szubsztrátok raktározása elenyésző, ezért a sejtek működéséhez és struktúrájának fenntartásához szükséges anyagcserefolyamatok teljes mértékben az aktuális vérellátástól függenek, azaz a vér O<sub>2</sub>- és glükóz tartalmától. Fiziológiai körülmények között az agy vérátáramlása globálisan állandó, lokálisan viszont a helyi anyagcsere szabályozásának megfelelően változó. Symon és munkatársai által végzett kísérletek hívták fel a figyelmet arra, hogy ha a vérátáramlás kritikusan lecsökken az agyban akkor az idegsejtek először a funkciót áldozzák fel a sejtek integritásának fenntartása érdekében (Symon és mtsai., 1977). A hypoxia súlyosabb fokánál ezt követi az agyi struktúrák épségének fenntartásához szükséges metabolikus aktivitás csökkenése. A fokális agyi ischaemiát modellezve megállapították a véráramlás azon küszöbértékeit amelyek meghatározzák az agy funkcionális és struktúrális épségét. Az agyi vérátáramlás átlagos értéke 45-55 ml percenként 100 g agyszövetre vonatkoztatva (Symon és mtsai., 1977). Az ischaemiás területnek azt a részét, ahol a legkifejezettebb a vérellátási zavar következtében kialakuló energiakrízis *core* régiónak nevezték el. A *core* vagy "mag" jelenti azt a központi régiót, amely az elsődlegesen károsodott területként definiálható (Nedergaard 1988). Az itt található sejtekre a nekrotikus jellegű, korai sejtpusztulás jellemző (Charriaut-Marlangue és mtsai., 1996). Kimutatták, hogy a *core* régióban a véráramlás nem haladja meg a 10 ml/ 100 g agyszövet / perc értéket, amely már a sejtek integritását megőrző alapszintű anyagcseréhez sem elegendő. Ez vezet végül a nekrotikus mag kialakulásához (Symon és mtsai., 1977). A vérátáramlás csökkenése a kialakuló glükóz és O<sub>2</sub>-hiányon keresztül egy többlépcsős, kaszkádszerű folyamatot indít be, mely végül a sejtek pusztulásához vezet (Hass 1983). A folyamat első lépéseként a glükóz- és O<sub>2</sub> szint csökkenését az ATP szint csökkenése

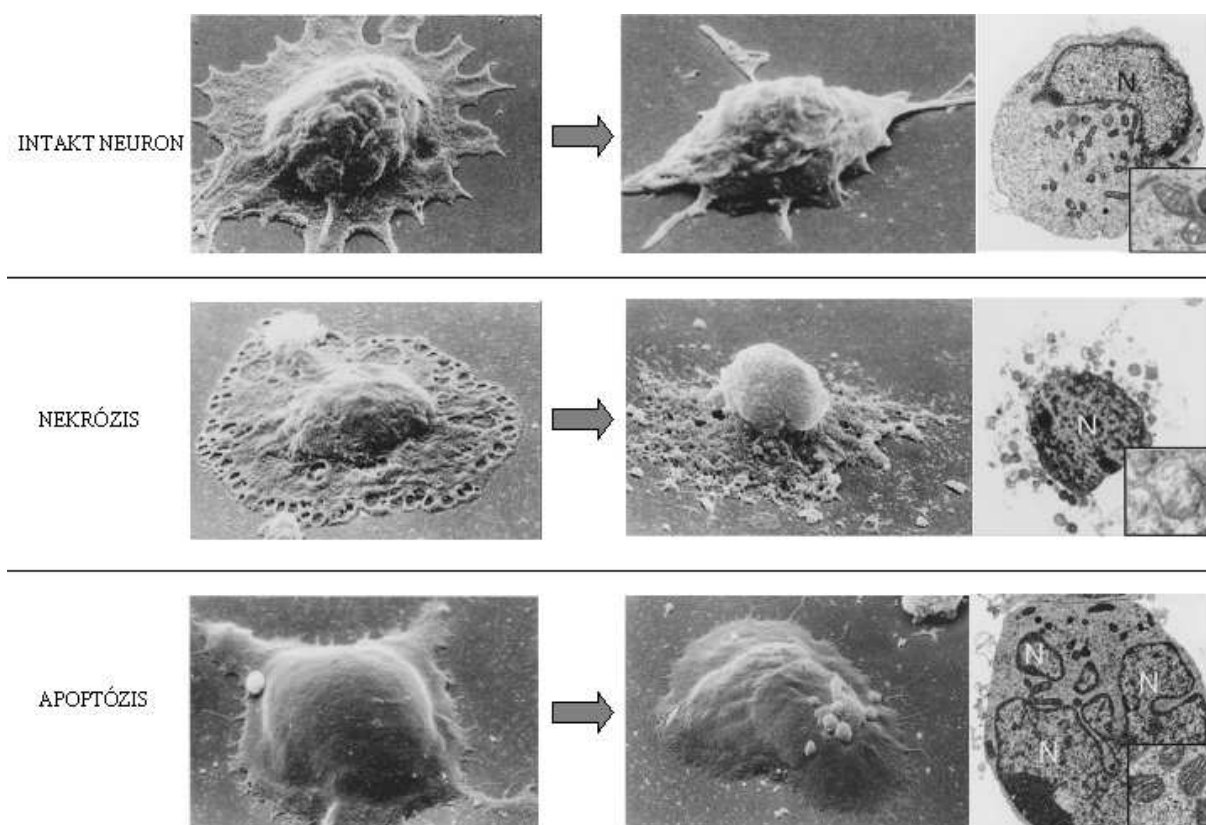
követi. ATP hiányában az ATP-függő ionpumpák működése zavart szenved és így az iongrádiensek tovább már nem biztosíthatók a sejtekben. Az iongrádiensek felborulása depolarizációt fog előidézni, melynek következtében excitatorikus aminosavak- elsősorban glutamát (Glu) - kerülnek a intercelluláris térbe. A nagy mennyiségben kiürülő serkentő aminosavak membráncsatornákhoz kötött receptorokat: N-metil-D-aszpartát- (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxalon-propionsav- (AMPA), kainát-receptorokat aktiválnak (Jatzke és mtsai., 2002). Ischaemiás környezetben a Glu -visszavételének mechanizmusai sérülnek és így az excitatorikus transzmitterek a sejt közötti térben felhalmozódnak (Zhang és mtsai., 1998). Ez a jelenség excitotoxicitást okoz és további depolarizációs hullámokat indukál (van Landeghem és mtsai., 2006).

A depolarizáció következtében megnyíló feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákon át  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok áramlanak a sejtekbe, amely több, egymással párhuzamosan futó folyamatot aktivál (Golstein és Kroemer 2007). További transzport mechanizmusok is közreműködnek az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint növekedésében: az aktív  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpák ATP-hiány okozta elégtelen működése, valamint az NMDA- és AMPA típusú glutamát receptorokkal rendelkező ioncsatornák megnyílása (White és mtsai., 2000). Az emelkedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint következménye a fokozott neurotransmitter felszabadulás és számos enzim aktiválódása. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok hatására kalpainok aktiválódnak, melyek proteolízist indítanak el a sejtekben. A kalpain indukálta proteolízis elsősorban a citoskeletális, szignáltranszdukciós proteineket és transzkripciós faktorokat érinti (Goll és mtsai., 2003). Emellett foszfolipáz- $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) és ciklooxygenáz aktiváció is fokozódik, mely szabadgyökök képződésén keresztül lipidperoxidációt indít el (Farooqui és mtsai., 1997). Ezek a folyamatok együttesen járulnak hozzá a sejtek funkciójának és szerkezetének megbomlásához. A kaszkáddal egyidőben a glükóz és  $\text{O}_2$ -hiány következtében anaerob glükolízis játszódik le, ami a lokális pH csökkenéséhez, acidózishoz vezet. Az acidózis miatt megváltozik az enzimaktivitás a sejtekben, amely tovább rontja a sejt energetikai viszonyait (Hovda és mtsai., 1992; Hertz 2008).

A nekrotikus sejtpusztulásnak jellemző morfológiai tulajdonságai vannak. Nekrózis esetén a sejtek térfogata megnő, egyes sejtorganellumok, pl. mitokondriumok megduzzadnak. A sejtmag szerkezete nem változik (1. ábra). Mivel a nekrózis a sejtmembrán integritásának megszűnésével jár, a sejttartalom a környezetbe jut, ahol gyulladásos reakciót vált ki (Ueda és Fujita 2004). A sejtek pusztulásához hozzájárul a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő neuronális nitrogén-monoxid

szintetáz (nNOS) aktivációja is. A keletkező nitrogén-monoxid (NO)  $O_2$ -tartalmú szabadgyökökkel peroxinitriteket képez és ezáltal további sejt- és szövetkárosodást okoz (Stoffel és mtsai., 2001). A lézió centrális, nekrotikus magjára tehát a teljes energetikai katasztrófa, a homeosztázis felborulása, valamint a lipolízis és proteolízis következtében gyorsan pusztuló sejtek jellemzők (2. ábra).

A core régiójával szomszédos területet, amely a nekrozissal elhalt centrum és a még ép agyállomány között található, penumbrának nevezték el. Az elnevezés a teljes holdfogyatkozáskor a holdárnyékot körülvevő, részlegesen megvilágított area analógiájára történt (Astrup és mtsai., 1981). Ebben a zónában a vérátáramlás 15-30 ml/100g/agyszövet/perc. Ez az áramlási érték már súlyos funkciókárosodást okoz, de a sejtek szerkezetileg még épek maradnak (Symon és mtsai., 1977). Mindezek alapján a penumbra olyan csökkent vérátáramlású területként definiálható, ahol a morfológiai integritás megtartott, de a sejtek funkciói már kiesést mutatnak. Jellemzője, hogy térfogata gyakran többszöröse a már irreverzibilisen károsodott központi mag térfogatának (Garcia és Anderson 1989). A penumbra leglényegesebb tulajdonsága azonban az, hogy az itt található sejtek döntően késleltetett sejthalállal, apoptózissal pusztulnak el (Rink és mtsai., 1995). Az apoptotikus sejtek morfológiailag is elkülöníthetőek a nekrozissal pusztuló sejtektől. Apoptózis során az elhaló sejtek elválnak a környező sejtektől, kapcsolatuk megszűnik az extracelluláris mátrix-szal, de a membrán hosszú ideig intakt marad. A sejt lekerekedik, majd membránján kitüremkedések jelennek meg. Az endoplazmatikus retikulum szerkezete fellazul, riboszómák szakadnak le róla, a Golgi-apparátus és a mitokondriumok morfológiája lényegében nem változik. A citoplazmában vakuolumok jelennek meg, a sejtmaganyag kondenzálódik és különálló darabokra esik szét. Az apoptosis végső stádiumában a DNS fragmentálódása már a végleges sejthalált jelenti. Végül a sejt membránnal határolt, különböző sejtalkotórészeket tartalmazó ún. apoptotikus testekre darabolódik (Ueda és Fujita 2004). Az apoptotikus testeket a környező sejtek fagocitálják és lizoszómáisan emésztődnek, emiatt nem indulnak be gyulladásos reakciók (1. ábra).



**1. ábra A nekrosis és apoptózis morfológiai különbségei scanning elektronmikroszkópos és transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken. Nekrosis: a sejtmembrán integritása megszűnik, a sejtmag szerkezete lényegében nem változik. Apoptózis: a sejt lekerekedik, membránja hosszú ideig intakt marad, a sejtmaganyag kondenzálódik, különálló darabokra esik (Ueda és Fujita 2004).**

Az agyi ischaemiában jelentkező apoptózis molekuláris mechanizmusának ismerete terápiás lehetőségeket kínál. Az apoptózis jelenségét még a hetvenes években írták le először, de csak a kilencvenes évektől kezdtek el intenzívebben kutatni, beleértve az apoptózis neurológiai vonatkozásait is. Az agyban jelentkező apoptózist elsődlegesen az oxigénhiány és a következményes ATP-csökkenés indítja el. Feltételezik, hogy az apoptózis és a nekrosis számos lépésben kapcsolódhat egymáshoz és az ischaemia súlyosságától függően átmehet egymásba (Ueda és Fujita 2004). Ha a hypoxia következtében jelentkező ATP-hiány szubletális mértékű az apoptózis eseménysora indul el. Ha az ATP-hiány átlépi a kritikus mértéket, nem apoptózist hanem nekrozist indukál. Ezt igazolni tudták azzal a kísérlettel, melyben a sejtől megvonták az ATP-t, az apoptózis ennek következtében az energiaigényes lépéseknél megállt és a folyamat a nekrosis irányába terelődött (Nicotera és mtsai., 2000). Az idegsejtekben mint minden más sejtben az apoptózist okozó proapoptotikus gének (pl. Bax,

Bad gének) és az apoptózist gátló antiapoptotikus gének (Bcl-2, Bcl-XL gének) termékei különféle heterodimerek képzésével módosítják egymás hatásait és döntő tényezői annak, hogy a sejt tovább él vagy pedig elpusztul (Leist és Nicotera 1998; Martin és mtsai., 1998). A pro- és antiapoptotikus tényezők egyensúlyának megbomlása indítja el az apoptózist. Ischaemia esetében a károsodott idegsejtet elsősorban az ATP-csökkenés billenti ki a pro- és antiapoptotikus egyensúlyi állapotából. Az apoptózis kezdeti eseménysorában- a nekrozishoz hasonlóan- döntő a  $\text{Ca}^{2+}$  intracelluláris koncentrációjának emelkedése (Wang és mtsai., 1999). Az emelkedett  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció enzimaktivációt (kalcineurin) eredményez, mely proapoptotikus fehérjék (Bax, Bad) aktiválásán keresztül a mitokondriumok rendellenes működéséhez vezet (Dubinsky és mtsai., 1999). Az idegsejtek mitokondriuma meghatározó szerepet játszik az apoptózis folyamatában, belőlük indul ki az apoptosis intrinsic- és kaspázfüggetlen útja (Sims és Anderson 2002). Mindkét útvonal, több lépésben a sejt mag DNS-ének fragmentálódásához vezet. Az apoptózist beindíthatják extracelluláris tényezők is az ún. halálreceptorok aktiválásán keresztül. Ebben az esetben az ischaemia miatt nekrotizáló és apoptózissal elpusztuló sejtekből tumornekrozisfaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) és Fas-ligand (Fas-L) szabadul fel, melyek megfelelő receptoraikhoz kötődve elindítják az apoptosis extrinsic kaspáz útját (Kawahara és mtsai., 1998). Az apoptózis molekuláris kaskádaktivációjában kiemelt szerepük van a kaspázoknak, a proteázok egyik csoportjának, melyek célfehérjéik hasításával idézik elő az apoptotikus sejt morfológiai átalakulását (Enari és mtsai., 1998).

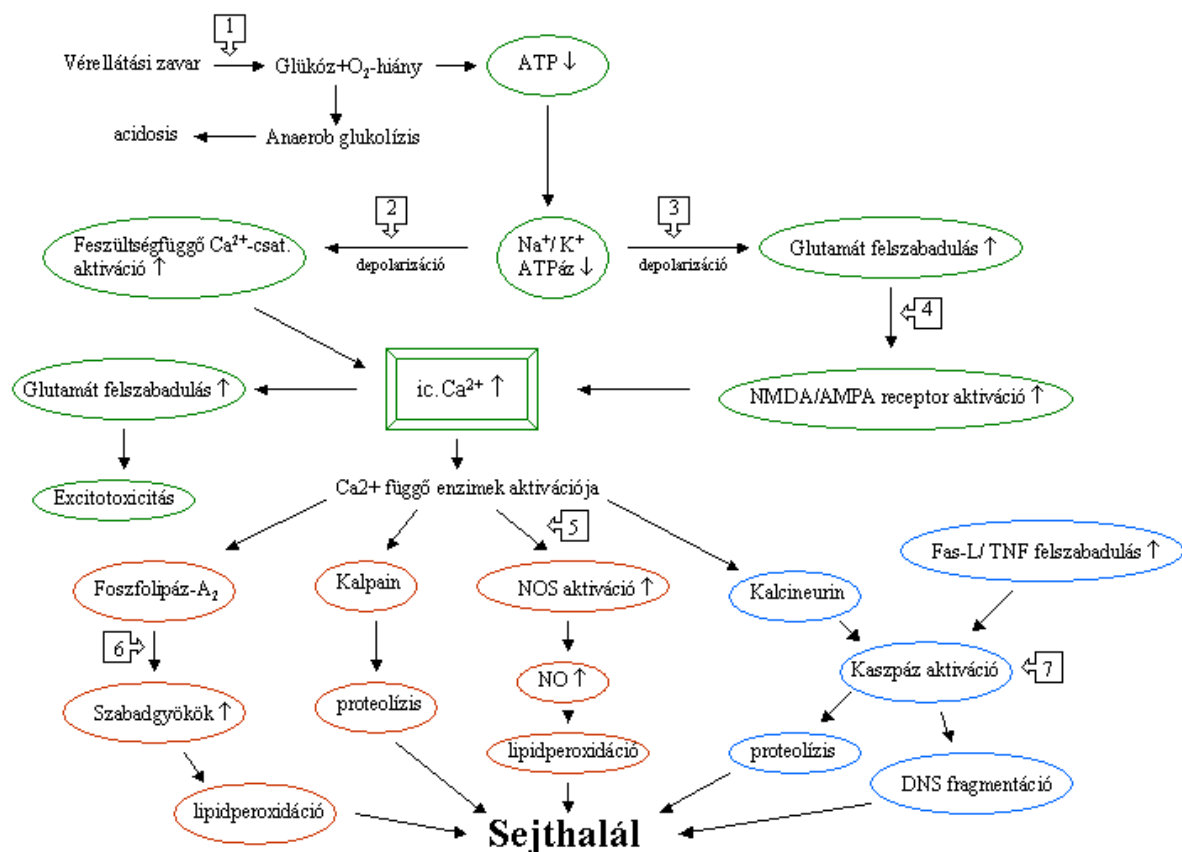
Az apoptózis indukálásában fontos szerepe lehet még az érelzáródást követő reperfúciónak. A reperfúzió a reoxigenizáció és a fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás révén további reaktív szabadgyökképződést és következményes membránkárosodást okoz az idegsejtben (Collard és Gelman 2001).

A penumbra ezen tulajdonságai alapján született meg a fokális ischaemia penumbra-teóriája, ami új irányvonalat adott a kutatásoknak (Touzani és mtsai., 2001). A penumbra került a kutatások középpontjába, a neuroprotektív stratégiák legfőbb célpontja lett. Klinikai jelentőségét az adja, hogy az agyi infarktus méretének akár csekély mérséklődése is a neurológiai funkció jelentős javulását eredményezheti. A legkézenfekvőbb megoldásnak az mutatkozott, hogy a penumbra sejtjei megmenthetők, ha a folyamatokat kezdeti, még reverzibilis fázisában leállítják. Elsőként a véráramlás helyreállításával próbálták kivédeni a penumbra szöveti elváltozásait. Hossmann munkacsoportja vizsgálta azt a hipotézist, hogy a véráramlás visszaállításával a penumbra bármikor reaktiválható és a régió életképes marad

(Hossmann 1982). A kísérletek során alkalmazott vazoaktív szerek azonban nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, mivel az infarktusos terület kiterjedése nem változott. A sikertelenség magyarázatát egy másik kutatócsoport eredményei szolgáltatták, melyek a figyelmet az időfaktor szerepére irányították. Megállapították, hogy a penumbra csak néhány órán át marad életképes (Lassen 1990). A jelenség hátterében a penumbrára jellemző késleltetett sejthalál, az apoptózis áll. A funkcionálisan már károsodott sejtek az idő előrehaladtával elindulnak az apoptózis útján (Du és mtsai., 1996). Az apoptózisra jellemző első morfológiai jelek megjelenése után maximum néhány óra alatt le is zajlik a folyamat és a penumbra területe mintegy beleolvad az irreverzibilisen károsodott core régióba (Eriskat és mtsai., 1994). A korábban még érintetlen ép területek pedig a penumbra részévé válnak (Plesnila és mtsai., 2003). Ezek a megfigyelések adták a klinikum szempontjából kiemelkedő fontosságú terápiás időablak jelentőségét. A terápiás időablak jelenti azt az idő intervallumot, ameddig a kezelés hatásos lehet. Ez az időtartam jelenleg 4-6 óra, ami a kezelés szempontjából rövid, hiszen magába foglalja azt az időt, amíg a tüneteket felismerik, a beteget kórházba juttatják, elvégzik az alapvető klinikai vizsgálatokat és a kórképet diagnosztizálják. A klinikusok részéről megfogalmazódott az igény olyan neuroprotektív hatású szerek kifejlesztésére melyekkel még a kórkép diagnosztizálása előtt biztonsággal lehetne kezelni a pácienseket (Harcos, 1999).

A neurológiai kórképek kimenetelét az eddig ismertetett pathofiziológiai eseményeken túl, további másodlagos károsodások is meghatározzák. A prognózis szempontjából gyakran ezek a másodlagos károsodások nagyobb jelentőséggel bírnak, mint az azonnali szöveti elhalást okozó elsődleges károsodás. Mind a traumás agyi sérüléseket, mind az ischaemiás stroke-ot követően felborul az agyszövet víz- és elektrolit homeosztázisa. Az egyensúly felborulásával a vízterek eloszlása zavart szenved és így agyduzzanat, illetve agyödéma alakulhat ki (Kahle és mtsai., 2009). A folyadéktartalom megnövekedése a koponya zárt terében elhelyezkedő agynál a beékelődés veszélyét rejtje magába, ami a beteg szempontjából végzetes kimenetelű lehet. Az agyödéma két fő típusát lehet megkülönböztetni a kialakulás mechanizmusának alapján (Murakami és mtsai., 1999). A cytotoxikus ödémában az intracelluláris-, míg a vasogén agyödémában az extracelluláris folyadékterek növekednek meg (Klatzo és mtsai., 1958; Fishman 1975). Agyi vérrellátási zavarok esetén mindkét formát igazolni lehet (Nag és mtsai., 2009). A cytotoxikus ödéma kialakulásában az ionhomeosztázist fenntartó energiaigényes pumpák elégtelen működése játszik szerepet,

melynek következtében megváltoznak a sejt ozmotikus viszonyai és víz áramlik a sejtekbe. A károsodott sejtmembrán miatt jelentős a folyadék intracelluláris felhalmozódása az ischaemiás stroke korai fázisában, amikor az érintett területen megszűnik a véráramlás (Liang és mtsai., 2007). A vasogén agyödéma kialakulását a vér-agy gát károsodása idézi elő. A vér-agy gát strukturális alapját az agyi kapilláris endothelsejtek és az ezeket összekapcsoló komplex záró sejtkapcsolat rendszer (tight junction) határozza meg, melyek permeabilitást szabályozó gátat képeznek. A barrier rendszer részét képezi az endothelsejtek basalis membránja, a pericyták, illetve a gliatopok. Ischaemiás periódusban a gliasejtek energetikai zavara következtében kialakuló sejttödéma összenyomja a potenciális kollaterális ereket, amely tovább rontja a szöveti perfúziót (Nag és mtsai., 2009). Az elégtelen perfúzió, valamint az ischaemia miatt sérülő endothelsejtek képtelenek tovább fenntartani a vér-agy gát integritását; az áteresztőképesség megnő, azaz a vér-agy gát “megnyílik”. A vazogén ödéma órákkal, napokkal az elzáródást követően alakul ki (Klatzo 1987). A vér-agy gát károsodásával ozmotikusan aktív anyagok kerülhetnek az agyba, tovább fokozva a szekunder sérülés mértékét. Kimutatták, hogy az endotheliás NOS szintje megnő az endothelsejtekben agyi traumát követően és szerepet játszik az endothelsejtek permeabilitásának fokozásában (Nag és mtsai., 2000). A reaktív oxigénradikáloknek ugyancsak szerepük van a vasogén agyödéma kialakulásában az endothelsejtek károsításának következtében (Chan és mtsai., 1987; Chan és mtsai., 1991). Az ischaemia során további vasogén ödémát indukáló tényező az arachidonsav felszabadulás (Chan és mtsai., 1983). Az ödéma mindkét formájának kialakulásában szerepet játszanak a cytotoxikus neurotranszmitterek, pl. glutamát (Stover és Unterberg 2000).



2. ábra Sejthalálhoz vezető pathofiziológiai folyamatok főbb lépései a központi idegrendszerben és a neuroprotektív terápiás stratégiák támadáspontjai. Piros szín: nekrosis lépései; kék szín: apoptózis lépései; zöld szín: közös lépések. 1. keringés helyreállítása (pl. thrombolysis), 2. feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna-antagonisták, 3. excitatorikus aminosav-antagonisták, 4. NMDA-receptor antagonisták, 5. NOS gátlók, 6. szabadgyök-antagonisták, 7. antiapoptotikus terápiák (pl. kaspáz-antagonisták)

### 3.1 Kezelési elvek

A neurológiai kórképek kezelésében alkalmazott módszerek köre az elmúlt évtizedekben jelentősen kibővült. Ennek oka, hogy az idegtudományok nagy léptékű fejlődésének következtében egyre több olyan ismeret került napvilágra, amely az idegrendszer károsodásában szerepet játszó összetett patomechanizmusok egyes részleteit tárták fel (2. ábra).

Bár vizsgálataink középpontjában két eltérő neurológiai kórkép kísérletes modellje áll, a kezelési elveknek vannak közös pontjai. Ezek közül a legkézenfekvőbb a kezelés időben történő elkezdése, amely a korábban ismertett terápiás időablak szűk intervalluma miatt döntő jelentőségű a kezelés sikeressége szempontjából. A másik fontos tényező, hogy a sejtpusztuláshoz vezető kaszkádfolyamat több lépése is célpontjául szolgálhat a



neuroprotektív terápiáknak. Mivel a károsodott terület mag régiójában a neuronok pusztulása néhány percen belül bekövetkezik (nekrózis), a neuroprotekciónak elsődleges célja a penumbra-ban zajló biokémiai változások blokkolása, a programozott sejthalál megelőzése, illetve késleltetése.

Stroke esetében a kiváltó tényező ismeretében a legfontosabb oki kezelés az elzáródott artériában a vérrög feloldásával a keringés helyreállítása, vagyis a thrombolysis (Cheng és mtsai., 2004). A keringés rendezésével a funkció is helyreállhat, de csak ha a thrombolysis egy meghatározott időtartamon belül következik be az ischaemia kialakulását követően. Ez az ún. reperfüziós-ablak, amely a terápiás időablak részét képezi. A meghatározott időintervallumon túl a sejthalálhoz vezető kaszkád egymást követő lépései akkor is lezajlanak, ha a keringés helyreáll (Dyker és Lees 1998). A keringés helyreállításának meg van azonban az a veszélye, hogy a spontán vagy thrombolysist követő reperfüzió során jelentősen megnő a szövetek oxigénellátottsága, a beinduló oxidációs reakciók sora végül az ún. reperfüziós károsodáshoz vezet (Collard és Gelman 2001). Ebben az esetben a reperfüzió még tovább is súlyosbíthatja az érelzáródás következményeit. Reperfüzió során a nagy mennyiségben felszabaduló szabadgyökök (pl. szuperoxid-, hidrogénperoxid-, hidroxil-szabadgyök) párosítatlan elektront hordoznak és a sejtalkotó lipideket, fehérjéket és nukleinsavakat közvetlenül károsítják (Toyokuni 1999; Sugawara és Chan 2003). Feltehetőleg a lipidmembrán peroxidációja az elsődleges mechanizmus, amin keresztül a szabad gyökök károsítják az agyszövetet. Normál körülmények között is keletkeznek a szervezetben szabadgyökök, de enzimek (pl. szuperoxid-dizmutáz (SOD), glutation-peroxidáz) és antioxidánsmolekulák (aszcorbinsav és alfa-tokoferol, azaz a C- és E-vitamin) képesek ezeket hatástalanítani (Cuzzocrea és mtsai., 2001). Agyi ischaemia és reperfüzió során a semlegesítő enzimek és antioxidánsok nem állnak rendelkezésre kellő mennyiségben és így érvényre jut a szabadgyökök károsító hatása. Az eliminációs reakciók hiányában a mitokondriumokban jelentős mennyiségben keletkező szabadgyökök magában a mitokondriumban idéznek elő károsodásokat, amelyek citokró-m-c felszabaduláshoz és végül DNS-fragmentációhoz vezetnek (Atlante és mtsai., 2001).

A neuroprotektív szerek egyik célpontja lehet az ischaemiában és reperfüzióban szerepet játszó oxigén-gyököknek a semlegesítése. Több tanulmány igazolta, hogy a szabadgyökök eliminálásában közreműködő védőenzimek és antioxidáns vegyületek fokozott bevitelével csökkenthető az ischaemiás és traumás agykárosodások kiterjedése és a vasogén agyödéma kialakulása (Imaizumi és mtsai., 1990; Kinouchi és mtsai., 1991; Chan 1992). A szuperoxid-

dizmutáz alkalmazása igen ígéretesnek bizonyult számos kísérletben, miután az enzim polietilén-glikolhoz kötésével sikerült kiküszöbölni az enzim rövid felezési idejéből adódó gyors lebomlását (Tang és mtsai., 1993). További kezelési lehetőséget jelenthet a reaktív oxigéngyökök felszabadulását korlátozó beavatkozások kifejlesztése, hatékony gyökfogó vegyületek alkalmazása, illetve endogén antioxidáns rendszerek aktivitásának fokozása.

A klinikumban alkalmazott antiaggregációs és antikoaguláns terápiák célja, hogy megakadályozza a thrombus nagyságának növekedését és a következő stroke kialakulását. Az aggregációt gátló szereknek nemcsak a stroke terápiájában, hanem annak megelőzésében is fontos szerepük van.

Továbbiakban röviden összefoglalom azokat a legfőbb neuroprotektív stratégiákat és vegyületeket, melyek az elmúlt években kerültek a kutatások középpontjába. Külön hangsúlyt helyezek az általunk is vizsgált neuroszteroidokra és a serkentő aminosav antagonistákra vonatkozó ismeretekre.

### ***3.1.1 NOS-gátlók***

A nitrogén-monoxidot (NO) L-argininből a nitrogén-monoxid szintetáz (NOS) képezi, mely enzimnek neuronális (nNOS), endotheliális (eNOS) és indukálható (iNOS) izoformája ismert. A nNOS aktiválódásának a feltétele, hogy a környezetében megnövekedjen az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció, vagyis az NMDA-receptorok aktiválódása közvetetten kiváltja a NO képződését. A NO szabad gyökökkel reakcióba lépve nagy reaktivitású hidroxí- és peroxinitrit gyököket képez, és a sejt vitális enzimrendszereit (légzési lánc) és örökítőanyagát károsítja (Moro és mtsai., 2004). Gorlach és munkatársai hideg léziós modellen a nNOS gátlásának neuroprotektív hatását mutatták ki (Gorlach és mtsai., 2000).

### ***3.1.2 Antiapoptotikus terápiás stratégiák***

Az utóbbi időben a neuroprotekciónak azon lehetséges módszerei kerültek az érdeklődés középpontjába, melyek az infarktus kiterjedésének másodlagos növekedésében szerepet játszó apoptózist befolyásolják (Lee és mtsai., 1999). Jelentőségüket az adja, hogy az apoptózis késleltetetten jelentkezik és így az antiapoptotikus terápiás ablak időtartama hosszabb. Az apoptotikus kaszkád mind pontosabb megismerése a lehetséges antiapoptotikus támadáspontok azonosításában is fontos szerepet játszik. Az antiapoptotikus terápiák alkalmazásánál azonban számolni kell olyan nem kívánatos következményekkel, mint a sejtpusztulás nekrotikus formájának előtérbe kerülése.

### **3.1.3 Feszültségfüggő $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna antagonisták**

A sejthalálhoz vezető egyik döntő esemény a  $\text{Ca}^{2+}$  nagymértékű beáramlása a sejtbe, amely az intracelluláris ionhomeosztázis felborulását, a membránpotenciál változását és számos enzim aktiválását eredményezi. Mivel a  $\text{Ca}^{2+}$  mind az apoptózis, mind a nekrozis eseménysorában kulcsion, a  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkolók mindkét eseménysor gátlása révén kifejthetik neuroprotektív hatásukat. A legrégebben vizsgált  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonista szerrel, a nimodipinnel kapott eredmények azonban nagyon ellentmondásosak. Meghatározott körülmények között az a szer kedvező hatását mutatták ki (The American Nimodipine Study Group, 1992). Más vizsgálatokban a szer alkalmazása tovább súlyosbította a páciensek állapotát, többek között a vérnyomás csökkentésével (Ahmed és mtsai., 2000).

### **3.1.4 Neurotrofinok**

Az idegnövekedési faktor (NGF), agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) hatására intracelluláris proteinkinázok aktiválódnak, melyek transzkripciós faktorokra hatva neuroprotektív antioxidáns enzimek pl. SOD és  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérjék képződését eredményezik. A neurotrofinok protektív hatásukat az apoptózis folyamatának szabályozásán keresztül is kifejthetik (Saito és mtsai., 2005).

### **3.1.5 Neuroszteroidok**

Az elmúlt évtizedekben egyre több, a szteroid hormonok bioszintézisében szerepet játszó prekursor vegyületről (pl. pregnenolon (PREG), dehidroepiandroszteron (DHEA)), illetve metabolitjaikról (allopregnenolon (THP), allotetrahydrodeoxikortikoszteron (THDOC)) derült ki, hogy neuroaktív tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezek a vegyületek az ún. neuroszteroidok, melyek az idegrendszerben koleszterolból *de novo* szintetizálódnak a neuronok, asztrociták és oligodendrociták mitokondriumában (Baulieu 1991; Baulieu és Robel 1998; Mellon és Griffin 2002). A neuroszteroidok bioszintézisének első lépése, hogy a koleszterol a citokróm P450 koleszterol oldallánc hasító (P450<sub>scc</sub>) enzim közreműködésével pregnenolonná alakul, ez a vegyület képezi a többi neuroszteroid fő prekursorát. A pregnenolon dehidroepiandroszteronná alakulását a citokróm P450<sub>c17</sub>-enzim katalizálja. A pregnenolon és a dehidroepiandroszteron szulfát észterek formájában is megtalálhatók az idegszövetben. A dehidroepiandroszteron tesztoszteronná alakulása két lépésben történik, melyben a 17 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz (17 $\beta$ -HSD) és 3 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz-

izomeráz (3 $\beta$ -HSD) enzimek játszanak szerepet. A tesztoszteron ösztradiollá alakulását aromatáz enzim katalizálja. A pregnenolon egy másik útvonalon progeszteronná, majd allopregnenolonná alakulhat (Baulieu és Robel 1998).

Több mint két évtizede ismert, hogy a DHEA és a dehidroepiandroszteron-szulfát (DHEAS) is megtalálható a központi idegrendszerben (Majewska és mtsai., 1986; Baulieu és Robel 1996; Compagnone és Mellon 1998; Zwain és Yen 1999). Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy a szteroidhormonokkal ellentétben, melyek intracelluláris receptorokkal kölcsönhatva szabályozzák a géntranszkripciót, a neuroszteroidok legfőbb tulajdonsága, hogy különböző membránhoz kötött receptorokon keresztül szabályozzák elsősorban a GABA-erg és glutamáterg neurotranszmissziót a központi idegrendszerben (Majewska és mtsai., 1986; Wu és mtsai., 1991; Debonnel és mtsai., 1996; Maurice és mtsai., 1999). A legfrissebb kutatások eredményei alapján azonban a neuroszteroidok intracelluláris receptorokra hatva is képesek szabályozni az idegsejtek működését (Leskiewicz és mtsai., 2006; Xilouri és Papazafiri 2006). A neuroszteroid vegyületek hatásmechanizmusa nagyon változatos, egyes képviselőik, pl. THP a GABA<sub>A</sub>-receptor aktiválásán keresztül váltja ki az idegsejtek membránjának hiperpolarizációját és így csökkenti a neuronok ingerlékenységét (Majewska és mtsai., 1986; Belelli és mtsai., 1990; Kokate és mtsai., 1994). Emellett képes gátolni a GABA<sub>A</sub>-receptor antagonisták (pl. pentiléntetrazol) által kiváltott rohamokat is (Kokate és mtsai., 1994). Kimonides és munkatársai bizonyították, hogy a DHEA és DHEAS NMDA-receptorokra hatva képes csökkenteni a serkentő aminosavak indukálta excitotoxicitást (Kimonides és mtsai., 1998). Hasonló eredményt mutattak azok a vizsgálatok, melyekben a DHEAS megvédte a hippocampus neuronjait a glutamát-indukálta neurotoxicitástól. A DHEAS neuroprotektív hatását azzal a képességével magyarázzák, hogy képes megnövelni a Nuclear factor-kappaB (NF $\kappa$ B)- transzkripció faktor aktivitást. Ezt a nézetet alátámasztja az a megfigyelés, hogy az NF $\kappa$ B DNS-hez való kötődésének gátlása megszünteti a DHEAS neuroprotektív tulajdonságát (Mao és Barger 1998). *In vitro* kísérletekben a neuroszteroidok hatásosnak bizonyultak az NMDA-indukálta nekrotikus és apoptotikus sejtpusztulás kivédésében (Lockhart és mtsai., 2002). Az apoptózisban elsősorban a mitokondriális folyamatok gátlása révén fejtik ki hatásukat, olyan módon, hogy megakadályozzák a citokróm-c felszabadulását a mitokondriumokból (Xilouri és Papazafiri 2006). A neuroszteroidok apoptózisra kifejtett gátló hatása megnyilvánulhat a foszfatidilinozitol-3 kináz/Akt-útvonal aktiválásán keresztül is. A DHEAS ezen intracelluláris mechanizmus révén

képes gátolni különböző, proapoptotikus fehérjéket, pl. Bad, kaszpáz-9 (Leskiewicz és mtsai., 2006). Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a DHEAS hasznos lehet olyan neurológiai betegségek kezelésében ahol a sejthalálért elsősorban az excitotoxicitás a felelős. Korábbi kísérletek alapján az is felvetődött, hogy a DHEA mint potenciális szignálmolekula szerepet játszik a neocortex embrionális fejlődésében (Compagnone és Mellon 1998; Compagnone 2008) és különböző neurotranszmitter-rendszerekkel kölcsönhatva elősegíti a neuronális újjáalakulást (Roberts és mtsai., 1987). A neuroszteroidok fő prekursor vegyületéről, a pregnenolonról kimutatták, hogy képes a mikrotubulus-asszociált protein 2-es típusához (MAP2) kötődve fokozni a tubulin polimerizációját, vagyis szerepet játszik a mikrotubulusok képződésében és így a neuronális plaszticitásban (Plassart-Schiess és Baulieu 2001). Számos kísérlet igazolta a neuroszteroidok pozitív szerepét különböző idegrendszeri elváltozásokban, pl. dementiában (Mayo és mtsai., 2001), stroke-ban (Sayeed és mtsai., 2006), epilepsziában (Biagini és mtsai., 2010), skizofréniában (Rao és Kolsch 2003), gerincvelő- és agy sérüléseiben (Compagnone 2008; Milman és mtsai., 2008), illetve Alzheimer- és Parkinson-kórban (Maurice 2002; D'Astous és mtsai., 2003).

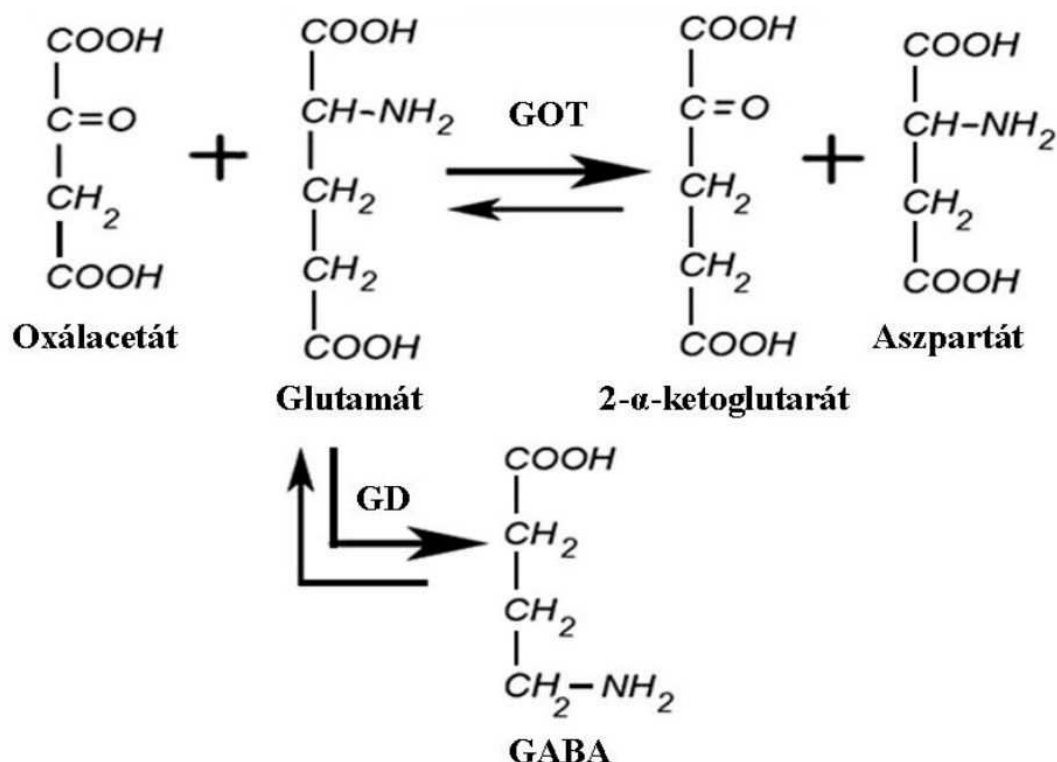
### **3.1.6 *Excitatorikus aminosav-antagonisták***

A Glu kiemelkedő szerepet játszik a neuronpusztulásban, amelynek mechanizmusában a kalcium- és nátriumion csatornák megnyílása, a NO mediálta folyamatok serkentése döntő szerepet játszik (Choi 1988; Meldrum és Garthwaite 1990; Benveniste 1991; Choi 1994). Számos akut és krónikus neurodegeneratív betegségben, többek között stroke-ban (Castillo és mtsai., 1997), traumás agysérülésekben (Zauner és mtsai., 1996; Bullock és mtsai., 1998), amyotrophiás lateralsclerosis-ban (Shaw és mtsai., 1995; Spreux-Varoquaux és mtsai., 2002) a megnövekedett Glu szint felelős az idegsejtek pusztulásáért. A Glu preszinaptikus felszabadulásának gátlása  $\text{Na}^+$ -csatorna blokkolókkal állatkísérletes modellben neuroprotektív hatású volt (Obrenovitch 1998). E szerek a penumbra területén gátolják a Glu felszabadulását, s így visszaszorítják a (post)excitotoxicitást.

Mivel az ionotróp Glu receptorok (NMDA-, AMPA-receptorok) aktivitását nagy mértékben befolyásolja a megemelkedett Glu-szint, ezek a receptorok is terápiás célpontok lehetnek. Az NMDA-receptoron található glicin és poliamin-kötő locusok blokkolásával lehet modulálni pl. a csatorna  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilitását (Stone 1993; Bordi és mtsai., 1997).

Az elmúlt években végzett biokémiai vizsgálatok alapján újszerű elmélet született arról, hogyan lehetne kivédeni a Glu excitotoxikus hatását. Az excitotoxicitás kivédésében kiemelt

szerepet tulajdonítanak a neuronok axon terminálisain és a gliasejtek membránján található Glu-transzportereknek, melyek képesek megkötni és felvenni az idegi működés során felszabaduló glutamátot. Működésük eredményeképpen a megnövekedett Glu-szint (~1mM) rövid idő alatt visszaáll a normál értékre (~1μM) és így az excitotoxicitás nem érvényesül (Danbolt 2001). Glu-transzporterek jelenlétét leírták az agyi erek endothelsejtjeiben is. Az endotheliális sejteken elhelyezkedő, Na<sup>+</sup>-függő Glu-transzporterek működése révén a Glu képes átlépni a vér-agy gáton és ezáltal a vér közvetett módon részt vehet a Glu extracelluláris koncentrációjának szabályozásában (O'Kane és mtsai., 1999). Nem lehet figyelmen kívül hagyni a vér-liquor gátat sem, melyben a choroid plexus aktív kiválasztással távolítja el a glutamátot a cerebrospinalis folyadékból a vérbe (Segal és mtsai., 1990). Valószínűsíthető, hogy az előbbi mechanizmusok szerepet játszanak az agy Glu detoxifikációjában, amikor az agy interstitialis és cerebrospinalis folyadékában abnormálisan megnő a Glu szintje. Az agyból vérbe történő Glu effluxnak azonban vannak korlátai, mivel a vérplazma Glu koncentrációja átlagosan 40-60 μM, ami sokszorosan meghaladja az agy cerebrospinalis, illetve interstitialis folyadékának 1-10 μM-os koncentrációját. Ez a koncentrációkülönbség nem kedvez a Glu agyból vérbe történő áramlásához. Az idegrendszeri károsodásokat kísérő magas extracelluláris Glu koncentráció azonban már lehetővé teszi, hogy az endotheliális sejtek transzportereik segítségével felvegyék és felhalmozzák a glutamátot. Ha a sejtekben a Glu koncentrációja meghaladja a vérplazmában található koncentrációt, a Glu az endotheliális sejtek lumenális membránján keresztül facilitatív transzporttal a vérbe szállítódik (O'Kane és mtsai., 1999). Gottlieb és munkatársai tesztelték azt a hipotézist, hogy fokozható-e az agyból vérbe történő Glu efflux, ha megnövelik az agy interstitialis és cerebrospinalis folyadéka, valamint a vérplazma között a Glu koncentrációjának különbségét, úgy hogy csökkentik a vérplazma Glu szintjét (Gottlieb és mtsai., 2003). A Glu koncentrációjának csökkentéséhez két vérben található enzimet használtak fel: a glutamát-piruvát-transzaminázt (GPT) és a glutamát-oxálacetát-transzaminázt (GOT), amelyek a Glu ko-szubsztrátjainak jelenlétében (piruvát és oxálacetát) a glutamátot 2-α-ketoglutaráttá és aszpartáttá alakítják. A Glu átalakulása 2-α-ketoglutaráttá és aszpartáttá kétirányú folyamat (3. ábra).



3. ábra A glutamátszint csökkentésének lehetősége oxálecetsav adás hatására. GOT: glutamát-oxalacetát-transzamináz, GD: glutamát-dekarboxiláz

Ha az oxálcetátot (OxAc), illetve piruvátot (Pyr) nagy koncentrációban, feleslegben alkalmazzuk, akkor a folyamat eltolható a 2- $\alpha$ -ketoglutarát és aszpartát keletkezés irányába, ami a Glu-szint csökkenésével jár együtt. A radioaktívan jelölt glutamáttal végzett kísérletek bizonyították, hogy az intravénásan keringésbe jutatott Pyr vagy OxAc lecsökkenti a vér Glu szintjét és ennek eredményeképpen nő az agyból a vérbe történő Glu efflux hatékonysága és sebessége (Gottlieb és mtsai., 2003). Mindezek alapján arra lehet következtetni, hogy az agy extracelluláris Glu tartalma a vér Glu szintjének változtatásával részben kontrollálható. A Pyr pozitív hatásait már bizonyították ischaemiában (Lee, 2001) és vérvesztést követő sokkos állapotban (Mongan és mtsai., 1999). A Pyr képes átjutni a vér-agy gáton, meggátolja a Glu felszabadulását és a neocortexben stabilizálja az energia felhasználást. Kísérletek rámutattak, hogy mind a Pyr, mind az OxAc protektív hatású traumás zárt fejsérülések esetén a Glu okozta excitotoxicitás kivédésében (Zlotnik és mtsai., 2008; Zlotnik és mtsai., 2009). Az OxAc további előnye, hogy a kiváltott hatás önkorlátozó. A vér Glu tartalmának csökkentése révén nő az agyból vérbe történő Glu efflux sebessége, ezzel párhuzamosan lassul az agy felesleges extracelluláris Glu tartalmának csökkentése. A kezelés után pedig a vér és az agy

Glu koncentráció értékei is képesek visszaállni a normális, fiziológiás értékre. A vér eredeti Glu koncentrációjának helyreállítását a glutamátot tartalmazó szervek-mint a máj és izomzat-Glu kiáramlással biztosítják (Hediger és Welbourne 1999). A cerebrospinális és interstitialis folyadék normális koncentrációjának értékei pedig egy fokozott, neuronokból és gliákból történő Glu szivárgással állhatnak helyre. Az OxAc tehát úgy képes eltávolítani a felesleges extracelluláris glutamátot az agyból, hogy az ne csökkenjen jelentősen az eredeti értékek alá (Biegon és mtsai., 2004; Vesce és mtsai., 2007).

Gladstone és munkatársai foglalták össze az elmúlt évtizedekben végzett vizsgálatok eredményeit, melyekben potenciális neuroprotektív szereket teszteltek (Gladstone és mtsai., 2002). Az eredményeket összegezve úgy találták, hogy a mindeddig kipróbálásra került szerek közül az intravénásan adott szöveti plazminogén-aktivátor bizonyult egyedülként hatásosnak, amennyiben az első három órában került alkalmazásra (Clark és mtsai., 1999; Katzan és mtsai., 2000).

A neuroprotekcóra irányuló kutatásokban sok nehézséget okoz, hogy az idegsejtek megmentését közvetlenül célzó terápiás stratégiák a preklinikai vizsgálatokban hatásosnak bizonyulnak, de a humán kipróbálás során nem váltják be a hozzájuk fűzött reményeket. A klinikai tesztelések kudarcainak nagyon sokféle oka lehet. Alapvető problémát jelenthet, hogy az állatmodellek nem tekinthetők teljesen megfelelő eszköznek a humán szervezetben megfigyelhető folyamatok megismeréséhez (Small és Buchan 2000). Ezt a nézetet támasztják alá a kutatócsoportunk által végzett elektrofiziológiai kísérletek is, melyek felhívták a figyelmet arra, hogy a kísérleti állatként használt beltenyésztett patkány törzs (Wistar) két vonala (Charles River és Harlan) sem hasonlítható össze ugyanabban a kísérleti felállásban (Marosi és mtsai., 2006). Problémát jelenthet még a kísérletes állatmodellek esetében, hogy a különböző jelenségek vizsgálata stabil körülmények között történik (altatás, kontrollált hőmérséklet, vérnyomás stb.). Ezzel ellentétben a klinikai vizsgálatok során a betegpopuláció nagyon heterogén. További hibaforrás lehet, hogy az állatkísérletekben a kezelés mércéje a károsodott agyállomány térfogatának változása, ugyanakkor a klinikai vizsgálatok a neurológiai tünetek és funkciók alapján értékelnek. Az állatkísérletek magasabb kérgi funkciók, akár az intellektus vizsgálatára sem adnak módot.

Tekintve hogy az idegrendszeri károsodások okozta események több vonalon folynak, valószínűtlennek látszik, hogy egyetlen vegyület alkalmazása elérje a kívánt neuroprotektív hatást. Ezért jogos a feltételezés, hogy bizonyos gyógyszerkombinációk alkalmazása hatás-



szinergizmusához vezethet. Különösen ígéretes lehet, ha stroke esetében thrombolyticus szereket egyéb neuroprotektív szerekekkel kombinálnak, növelve ezzel a terápiás ablakot és csökkentve a reperfúziós károsodást. Terápiás megközelítéseket jelenthetnek még az agyi plaszticitás fokozásában rejlő lehetőségek kihasználása (Johansson és Grabowski 1994), a neurotrofinok és egyéb növekedési faktorok célterületre juttatása, valamint az őssejtek és génterápiák alkalmazása (Grabowski és mtsai., 1994).

## **4. CÉLKITŰZÉSEK**

### **4.1 Trauma modell**

#### **4.1.1 Evans Blue és TTC festés alkalmazása hideg léziós modellen**

Kísérleteinkben a hideg lézió által kiváltott szöveti elváltozásokat tanulmányoztuk patkányok agykérgén.

1) Elsődleges célkitűzésünk az volt, hogy adaptáljunk egy olyan szövettani módszert, mely alkalmas a lézió, valamint a penumbra kiterjedésének rövid idő alatt történő meghatározására és a károsodott sejtek azonosítására.

#### **4.1.2 DHEAS elő- és utókezelés hatásának vizsgálata**

Fokális kérgi hideg léziós modellen tanulmányoztuk a DHEAS elő- és utókezelés hatását, mely vegyület más modellekben neuroprotektív hatásúnak bizonyult. Kísérleteinkkel azt vizsgáltuk, hogy a DHEAS elő- vagy utókezelés formájában hatékony-e a trauma által kiváltott szöveti pusztulás kivédésében. Ugyanebben a kísérleti felállásban vizsgáltuk az E<sub>2</sub> elő- és utókezelés hatását, valamint azt, hogy a letrozole -mely egy aromatáz inhibitor- milyen módon befolyásolja a DHEAS hatását.

2) Következő célkitűzésünk annak vizsgálata volt, hogy a fokális kérgi hideg léziós modellt alkalmazva, az általunk vizsgált szteroidok rendelkeznek-e neuroprotektív hatással.

### **4.2 Stroke modell**

#### **4.2.1 Glutamát scavenger oxálecetsav neuroprotektív hatásának vizsgálata**

3) Kísérletsorozatunkban mesterségesen létrehozott trombózissal idéztünk elő szöveti károsodást patkányok agykérgén. Azt vizsgáltuk, hogy az oxálecetsav, mint potenciális neuroprotektív anyag milyen módon befolyásolja a lézió kiterjedését és a degenerálódott neuronok számát.

## 5. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 5.1 *Trauma modell*

Kísérleteinkben 300-350 gramm tömegű, hím Wistar patkányokat használtunk (n=41). Az altatáshoz ketamin (Ketanest 10 mg/100g; Parke Davis, Berlin, Germany) és xylazin (Rompun 0,8 mg/100g; Bayer, Leverkusen, Germany) keverékét használtuk, melyet intraperitoneálisan (i.p) adtunk be. A kísérletek ideje alatt további, kiegészítő dózisokat adtunk (2 mg/100 g ketamin, illetve 0,16 mg/100 g xylazin) a megfelelő szintű anesthesia fenntartásához. Az altatást követően sztereotaxiás készülékben (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) rögzítettük az állatok fejét és a bal oldali motoros kéreg felett -a bregmától rostrálisan és laterálisan 1,5 mm-re a koponyacsontot kifúrtuk és feltártuk az agyat. A dura matert érintetlenül hagytuk.

Az állatok egyik csoportjánál (n=28) az elsődleges motoros kérgen idéztünk elő hideg léziót réz termód segítségével. A speciálisan ehhez a kísérletsorozathoz készített, 2 mm átmérőjű, réz termódot -78°C-ra hűtöttük aceton és szárazjég keverékével (Gorlach és mtsai., 2000; Hortobagyi és mtsai., 2000). A lehűtött termódot 30 másodpercig érintettük az agyhoz. A műtét alatt az állatok testhőmérsékletét  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk egy infralámpa segítségével.

Kontroll csoportként ún. álműtött állatokat használtunk (n=13). Ezeket a patkányokat is hasonló beavatkozás alá vetettük, azzal a különbséggel, hogy szobahőmérsékletű termódot érintettünk a feltárt agykéreghez. A műtétet követően, az állatok agyában kialakult léziós területet többféle festési eljárással tettük láthatóvá. A kísérletek során az állatok gondozását és laboratóriumi felhasználását az EU szabványaival összhangban és az SZTE Etikai Bizottságának jóváhagyásával végeztük.

#### 5.1.1 *TTC festés*

A TTC (2,3,5-trifeniltetrazolium klorid) festés általánosan használt módszer az idegrendszeri sejtelhalás és neuroprotektív vegyületek hatékonyságának gyors és egyszerű kimutatására. A módszer alapja egy biokémiai folyamat, mely szerint a TTC-oldat a szöveten belül hidrogént vesz fel a dehidrogenázoktól és az élő sejten belül vízben oldhatatlan, vörös színű trifenil-formazánná alakul. Az elhalt sejtek a TTC-oldatot nem redukálják, így a vörösre színeződött élő és a színtelen, elhalt területek jól elkülöníthetővé válnak.

A hideg lézió kialakítását követően, négy órás túlélési idővel hat állatot dekapitáltunk, majd agyukat eltávolítottuk a koponyából. A károsodott területből 0,4 mm vastagságú,

koronális metszeteket készítettünk vibratómmal (Campden Instruments, Sileby, UK). Az agyszeleteket 1 %-os TTC-oldatba (Sigma, Munich, Germany) helyeztük, melyhez a TTC-t mesterségesen előállított cerebrospinális folyadékban (130 mmol/l NaCl, 3,5 mmol/l KCl, 1 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 3 mmol/l MgSO<sub>4</sub>, 10 mmol/l (+) D-glükóz) oldottuk fel. Miután a reakció lezajlott (~20 perc), a szeleteket 4 %-os paraformaldehid oldatban egy éjszakán át fixáltuk. Az álműtött állatok közül négynél szintén TTC festét alkalmaztunk. A megfestett szeletek digitális képét scanner-rel rögzítettük (Hp Scanjet 2400).

	<b>TTC</b>	<b>EB</b>	<b>Fiz. só</b>	<b>Σ</b>
<b>Álműtött</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>13</b>
<b>Hideg lézió</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>9</b>	<b>28</b>
<b>Össz</b>				<b>41</b>

**1. táblázat: Az állatok számának megoszlása a különböző kísérleti csoportokban**

### **5.1.2 Evans Blue festés**

Az Evans Blue (EB) festést gyakran használják a vér-agy gát károsodásainak nyomon követésére. A keringésbe juttatott EB a szérum albuminhoz kötődik és ott, ahol a vér-agy gát megsérül, az albuminhoz kötött festék átjut az agy szövetébe, amit a sérült sejtek felvesznek (Wolman és mtsai., 1981). Fluoreszcens mikroszkóppal lehetőség nyílik az érintett terület és a sérült sejtek vizsgálatára.

A hideg lézión átesett állatok közül további tizenhárom patkánynál alkalmaztunk EB jelölést. A 2 %-os EB-oldatot (Sigma, St. Louis, MO) az állatok farokvénájába injektáltuk (0,2 ml). Az EB beadása a hideg lézió kialakítását követően három és fél órával történt. Ezután fél óra elteltével az állatokat transcardiálisan perfundáltuk. Az agyakat a koponyából eltávolítottuk és egy éjszakán át utófixáltuk. Az EB által jelölt területből 50 µm vastagságú, koronális metszeteket készítettünk vibratómmal. A metszeteket fluoreszcens mikroszkóppal (BX51, Olympus, Tokyo, Japan, Olympus DP-70 hűtött fluoreszcens színes kamerával), 530-550 nm gerjesztési, illetve 590 nm emissziós hullámhosszal vizsgáltuk.

Az álműtött állatok közül hatnál szintén EB jelölést alkalmaztunk (1. táblázat).

Ennél a festési eljárásnál külön kontroll csoportként olyan állatokat használtunk, melyek az EB festék helyett, ugyanolyan mennyiségű fiziológias sóoldatot kaptak. A csoportból kilenc állat szintén hideg lézió esett át, míg három állatot az álműtött csoporthoz hasonlóan kezeltünk. Ennek a csoportnak a segítségével vizsgáltuk az agy szövetének autofluoreszcenciáját, az előzőekkel megegyező gerjesztési és emissziós paraméterek mellett.

### **5.1.3 NeuN festés**

Trauma modellünk kísérleti adaptálásánál szükségessé vált olyan szövettani módszerek alkalmazása, mellyel bizonyítani tudtuk azoknak a sejteknek a jelenlétét, melyek a lézióban érintett területen található, de károsodásuk még visszafordítható. A NeuN- és Fluoro Jade festés együttes alkalmazásával egy metszeten belül láthatóvá tudtuk tenni ezen sejtek térbeli eloszlását.

A NeuN (Neuronal Nuclei) olyan idegsejt specifikus sejtmag protein, melynek immunhisztokémiai detektálása kiváló neuron markerként szolgál a központi- és perifériás idegrendszerben egyaránt (Mullen és mtsai., 1992). A NeuN festés alkalmasnak bizonyult korábbi kísérletekben ischaemia okozta sejtpusztulás nyomon követésére (Schmidt-Kastner és Olson 1995; Domorakova és mtsai., 2006).

A kísérleti állatokat (n=8) a négy órás túlélést követően transcardiálisan perfundáltuk, agyukat a koponyacsontból eltávolítva utófixáltuk. A léziós területből 36 µm vastagságú szeleteket metszettünk fagyasztó microtommal (Frigomobil Model 1206, Reichert-Jung, Nußloch, Germany), melyeket 3x10 percig TBS (Tris-Buffered Saline: 0,1 M TRIS-HCl (pH 7,4); 0,15 M NaCl) és 0,4 %-os TRITON-X 100 keverékével mostunk. Az aspecifikus kötőhelyeket 1 %-os NGS-szel (normal goat serum) blokkoltuk egy órán át. A blokkoló szérum eltávolítása után a metszeteket primer antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át (Mouse Anti-NeuN; Chemicon International; hígítás 1:2000). Másnap a szeleteket 3x10 percig mostuk TBS és 0,4 % TRITON keverékével. Ezt követően a szeleteket szekunder antitesttel inkubáltuk 3 órán át (Cy<sup>TM</sup> 3-conjugated Donkey Anti-Mouse IgG; Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.; hígítás 1:1000). A szeleteket ismét 3x10 percig mostuk, majd tárgylemezre húztuk fel. A metszeteket fluoreszcens mikroszkópon 530-550 nm gerjesztési és 590 nm emissziós hullámhosszal vizsgáltuk.

Ezzel a kísérlettel célunk az volt, hogy ugyanazon metszeten láthatóvá tudjuk tenni a még élő és a már károsodott idegsejteket, ezért a metszetek száradása után, másnap Fluoro-Jade B festést alkalmaztunk.

#### **5.1.4 Fluoro-Jade B festés**

A Fluoro-Jade B® (FJB) egy anionos fluorochrom, mely szelektíven képes festeni a degeneratív neuronokat. Előnye, hogy egyszerű és érzékeny módszer, mely más immunhisztokémiai és fluoreszcens eljárásokkal kombinálható (Schmued és mtsai., 1997).

A tárgylemezre felhúzott metszeteket első lépésben leszálló alkoholsoron vittük át: 96 %-os alkoholban 3 percig, 70 %-os alkoholban 2 percig, desztillált vízben 1 percig hagytuk állni a szeleteket. Ezt követően 0,06 %-os  $\text{KMnO}_4$  oldatba helyeztük a metszeteket 15 percre. Desztillált vízben leöblítettük a tárgylemezeket, majd 0,001 %-os Fluoro-Jade B oldatba (Chemicon, Millipore Ltd., Hungary) helyeztük 30 percre. A FJB oldatot mindig frissen, a festés megkezdése előtt készítettük el FJB törzsoldatból. A törzsoldat hűtőben tárolva legalább két hónapig felhasználható. A 0,01 %-os törzsoldatból 10 ml-t adtunk 90 ml 0,1 %-os ecetsavhoz. A festési procedúrát desztillált vizes mosással fejeztük be (3x1 perc). A metszeteket egy napig sötétben szárítottuk, majd másnap Fluoromount®-tal (SERVA, Germany) lefedtük és fluoreszcens mikroszkópon 470-490 nm gerjesztési, illetve 520 nm emissziós hullámhosszal vizsgáltuk. A mikroszkópizálás során ugyanarról a metszetről készítettünk felvételeket, először a NeuN-festésnek megfelelő gerjesztési és kibocsátási paraméterekkel, majd pedig a FJB-festésnek megfelelő beállításokkal. Az így elkészített felvételeket számítógép segítségével egymásra montíroztuk.

#### **5.1.5 DHEAS és $E_2$ - kezelés**

Kísérletsorozatunkban a hideg lézió indukálta szöveti károsodás kiterjedésének változását tanulmányoztuk DHEAS kezelés hatására. Fiatal, 50-55 gramm tömegű, hím Wistar patkányokat használtunk, a hideg lézió kiváltásának kísérleti körülményei az előzőekkel megegyezők voltak. Hat csoportot vizsgáltunk:

- 1) Az előkezelt csoport állatai (n=11) a beavatkozást megelőző napon és a hideg lézió kiváltása előtt egy órával kaptak DHEAS kezelést (50 mg/kg; Steraloids, Newport, RI) subcutan injekció formájában.
- 2) A DHEAS utókezelt csoport (n=14) a szteroidot ugyanabban a koncentrációban kapta, közvetlenül a lézió kiváltását követően.
- 3) A kontroll csoport (n=6) desztillált vizet kapott, ugyanazon a módon.
- 4) Kísérletünkben megvizsgáltuk a letrozole hatását, amely egy nem-szteroid aromatáz inhibitor. Ez a csoport (n=5) a DHEAS-ot az előzőekben tárgyalt

előkezelt csoporthoz hasonló módon kapta, a letrozole-t (4 mg/kg paraffinolajban oldva) pedig egy órával a szteroid kezelést megelőzően.

- 5) Az  $17\beta$ -ösztadiol ( $E_2$ )-előkezelt csoport állatai (35 mg/kg szezámolajban oldva; Sigma, Munich, Germany) a szteroidot a DHEAS-kezeléssel megegyező módon kapták (n=7).
- 6)  $E_2$ -utókezelt csoport (n=8) kezelése ugyanolyan módon történt, mint a DHEAS-utókezelt csoportnál.

A lézió kiváltása után egy órával a kísérleti állatokat dekapitáltuk. A károsodott régió teljes terjedelméből 0,4 mm-es, koronális szeleteket metszettünk vibratommal. A sérülést 1 %-os TTC-oldattal tettük láthatóvá, melyhez a TTC-t mesterségesen előállított cerebroszpinális folyadékban oldottuk fel. A festett szeletekről scanner segítségével (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA; 1200 dpi felbontással) készítettünk digitális felvételeket. Minden szeleten az érintett területet Adobe Photoshop programmal (version 8.0; San Jose, CA.) lemértük. A kapott területeket összeadva, majd megszorozva a szeletek vastagságával meg tudtuk határozni a sérülés teljes térfogatát köbmilliméterben.

#### **5.1.6 Statisztikai analízis**

Az adatok további statisztikai elemzését Origin (version 7.0; OriginLab Corp., Northampton, MA) és SPSS12 (Chicago, IL) szoftverrel végeztük. A mért paramétereket átlag  $\pm$  S.E.M.-mel adtuk meg. A csoportok összehasonlításánál one-way ANOVA-t használtunk post hoc Bonferroni teszttel. A különbségeket \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  és \*\*\*  $p < 0,001$  esetén tekintettük szignifikánsnak.

### **5.2 Stroke modell**

A stroke modellezésének egyik elterjedt módja a fotokémia úton előidézett trombózis, az ún. fototrombotikus lézió. A módszer előnye, hogy segítségével jól reprodukálható módon lehet előidézni ischaemiát az agykéregben. Ennél a módszernél egy fotoszenzitív festéket, Rose Bengalt juttatnak a keringésbe intravénásan. A festék fény hatására a vérlemezkék aggregációját, thrombus kialakulását idézi elő (Watson és mtsai., 1985).

A kísérleteinkben 300-350 gramm közötti hím Wistar patkányokat használtunk (n=18). Az altatás a korábbiakhoz hasonlóan, ketamin és rompun keverékével történt. Altatást követően a kísérleti állatok fejét sztereotaxiás készülékben rögzítettük, majd a fejtetőről a bőrt

eltávolítottuk, a koponyacsontot gondosan megtisztítottuk. Az elsődleges szomatoszenzoros kéreg fölé hideg fényű, 5 mm átmérőjű száloptikát helyeztünk (Fibrolux 150H), mely közvetlenül a letisztított koponyacsonttal érintkezett. Az állatok farokvénájába injektáltuk a Rose Bengalt (30 mg/ml, 1 ml/testsúly kg; Sigma-Aldrich, Munich, Germany), majd ezt követően 20 percig megvilágítottuk az agykérget a koponyacsonton át.

A kísérletben résztvevő állatok egyik csoportja a megvilágítást követően oxálecetsavas (OxAc) kezelést kapott (n=6). Az oxálecetsavat (1,2 mg/100g, 50  $\mu$ mol/perc, 0,2 M-os foszfát pufferben oldva; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) szintén a farokvénán keresztül adtuk be, 30 perc alatt.

Mind a kontroll, mind az OxAc-kezelt csoportot négy órás túlélést követően transcardiálisan perfundáltuk. A koponyából eltávolított agyakat egy éjszakán át 4 %-os paraformaldehid oldattal utófixáltuk. A lézióban érintett terület teljes egészéből 36  $\mu$ m vastagságú szeleteket metszettünk microtommal. Az érelzáródás következtében károsodott terület kiterjedését és a degenerálódott neuronokat Fluoro-Jade B festéssel tettük láthatóvá. A FJB festés kivitelezése a trauma modell esetében már ismertetett módon történt. Minden megfestett szeletről fluoreszcens mikroszkóppal felvételeket készítettünk, egyenként lemértük a lézió teljes területét, majd a szeletek vastagságának ismeretében pontosan meghatároztuk a lézió kiterjedését mm<sup>3</sup>-ben. Nagyobb nagyítás mellett a FJB-pozitív sejtek számát határoztuk meg területegységre vonatkoztatva.

### **Vegyszerek**

A vegyszereket, amelyeknél külön nem tüntettük fel az eredetet, a Sigma-Aldrich Hungary Kft. biztosította.

#### ***5.2.1 Statisztikai analízis***

A statisztikai analízist SPSS for Windows version 9.0 szoftverrel végeztük. A paramétereket átlag  $\pm$  S.D.-vel adtuk meg. A kontroll és kezelt csoport átlagértékeit páratlan t-teszttel hasonlítottuk össze. A különbségeket \* p<0,05 esetén tekintettük szignifikánsnak. A kísérletek kiindulási és végső állatszámát százalékban adtuk meg. A kiindulási állatszámot 100%-nak tekintettük és ehhez viszonyítva határoztuk meg a végső állatszámot.

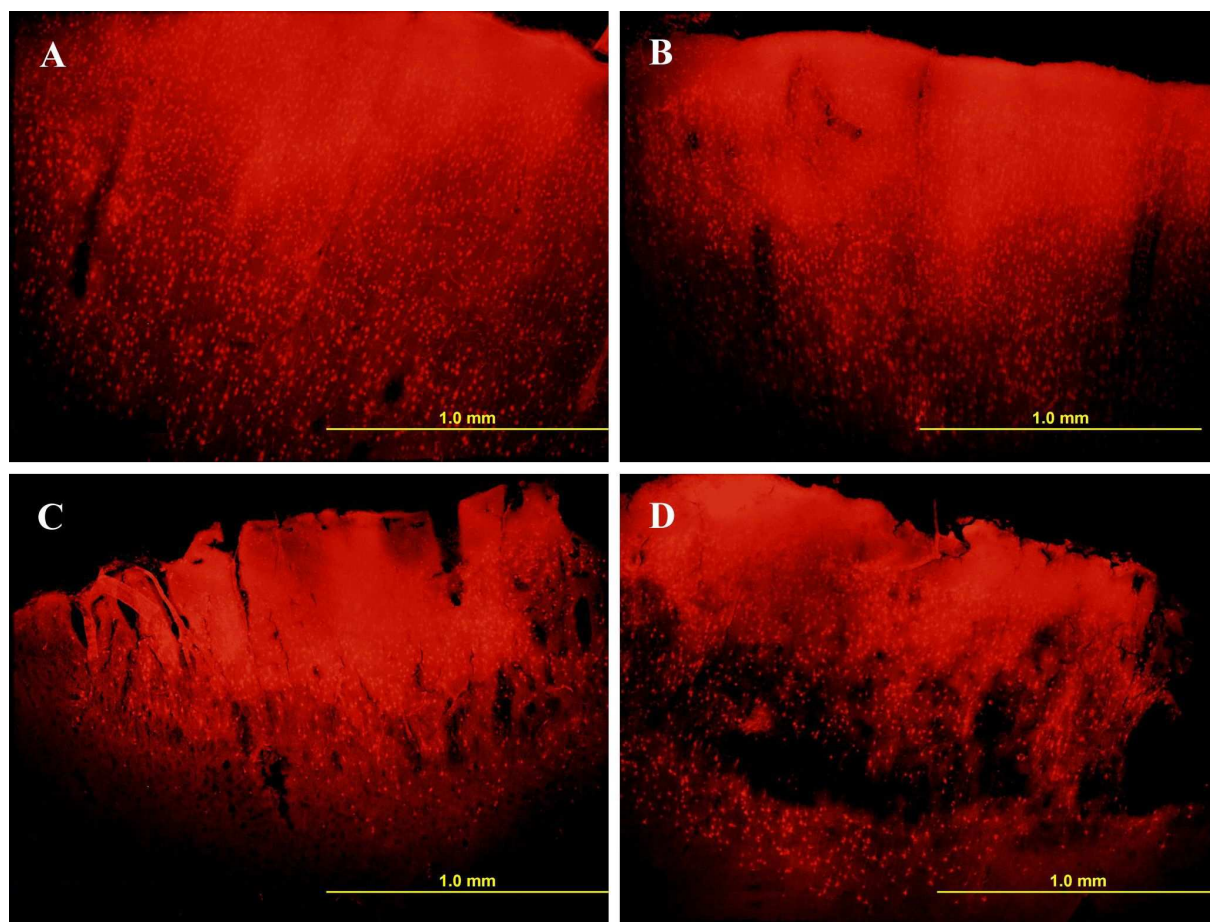


## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1 Trauma modell

#### 6.1.1 Evans Blue- és TTC-festés

Kísérleteink kezdeti szakaszában, a hideg lézió kiváltását követően különböző túlélési idejű (0, 4, 8 és 12 óra) csoportokat vizsgáltunk. A kísérletek további tervezése szempontjából fontos különbség mutatkozott az eltérő túlélési idejű csoportok között. Azoknál a kísérleti állatoknál, melyeknél a hideg lézió kiváltását követően nyolc, illetve tizenkét órát éltek túl, a kéri állományban az érintett területek kiszakadtak. Ezeknél az agyszeleteknél technikai okokból nem volt mód a károsodott kéri régió mikroszkópos vizsgálatára. A vizsgálatainkat tehát négy órás túlélési idővel folytattuk (4. ábra).



4. ábra: Reprezentatív mikroszkópos felvételek hideg lézió után átesett, Evans Blue-jelölt állatok agyából származó metszetekről. A: 0 órás túlélési idő, B: 4 órás túlélési idő, C: 8 órás túlélési idő, D: 12 órás túlélési idő.

Többféle festési módszert alkalmaztunk a hideg lézió átesett állatok agykérgében kialakuló elváltozások szövettani kimutatására.

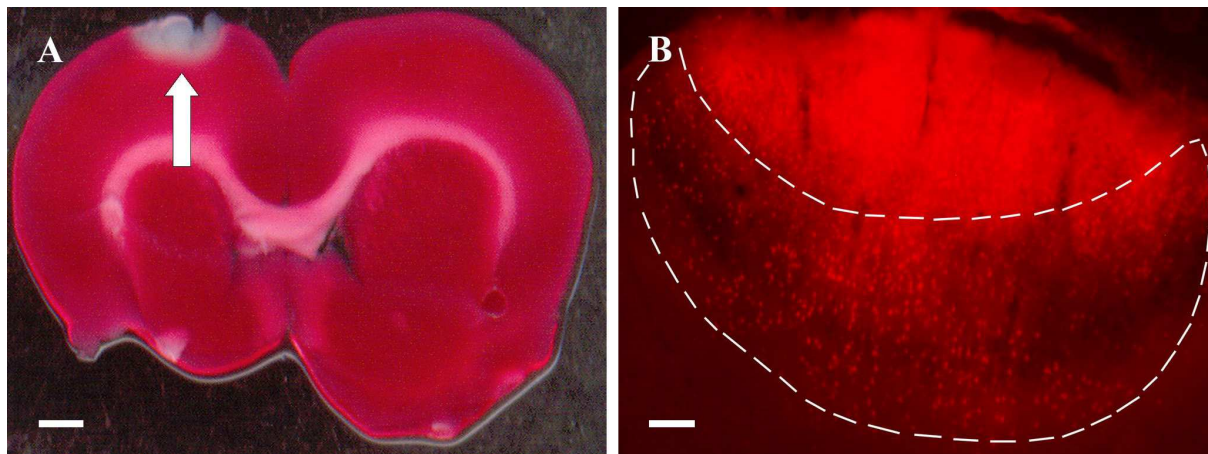
Az álműtött állatok agyából készített metszetek egyikén sem mutatkozott sérülésre utaló jel sem a TTC-festés, sem az EB-festés során. Hasonló módon nem volt megfigyelhető jelölődés a fiziológiás sóoldattal kezelt álműtött állatoknál.

A hideg hatásának kitett agyakból származó metszeteken a TTC-festés jellegzetes képet mutat. Az érintetlen, ép agyszövet vörösre festődik, míg a hideg által elhalt terület fehér marad. A két területet egy keskeny, átmeneti (rózsaszín) sáv választja el egymástól (5. ábra A). A nem festődő terület kiterjedése egyszerű módon mérhető.

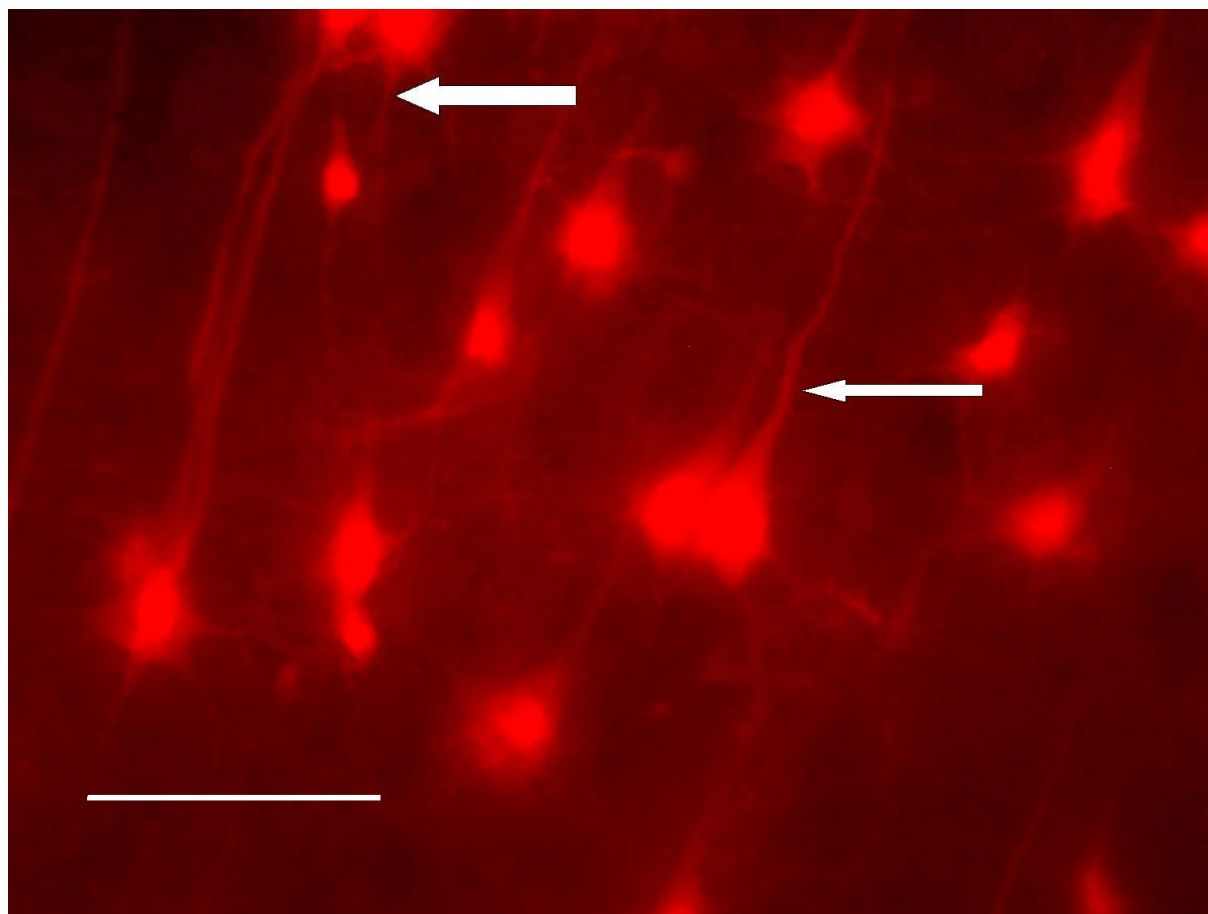
### **EB-pozitív sejtek detektálása**

Evans Blue festéssel vizualizálni tudtuk azokat a területeket az agykéregben, ahol a vér-agy gát megsérült a trauma következtében és az albuminhoz kötött EB kilépett az agyszövetébe. Az agyakon már makroszkopikusan is jól követhető ez a folyamat, az EB jellegzetes kék színe miatt. Fluoreszcens mikroszkóppal készített felvételeken az EB vörösen fluoreszkál az érintett régióban. A károsodott terület mag régiójában az EB fluoreszkálása viszonylag homogén, összefüggő területként jelenik meg. A mag régiótól távolodva egyre jobban elkülöníthetővé válnak a fluoreszkáló, EB-jelölődött sejtek (5. ábra B).

Nagyobb nagyításnál a penumbra régióban található EB-pozitív sejteken jól láthatóvá válik a sejtest és a belőle eredő apikális és bazális dendritek (6. ábra). Az EB-pozitív sejtek könnyen számolhatóak és aránylag egyszerű módon meghatározható a területegységre vonatkoztatott számuk.



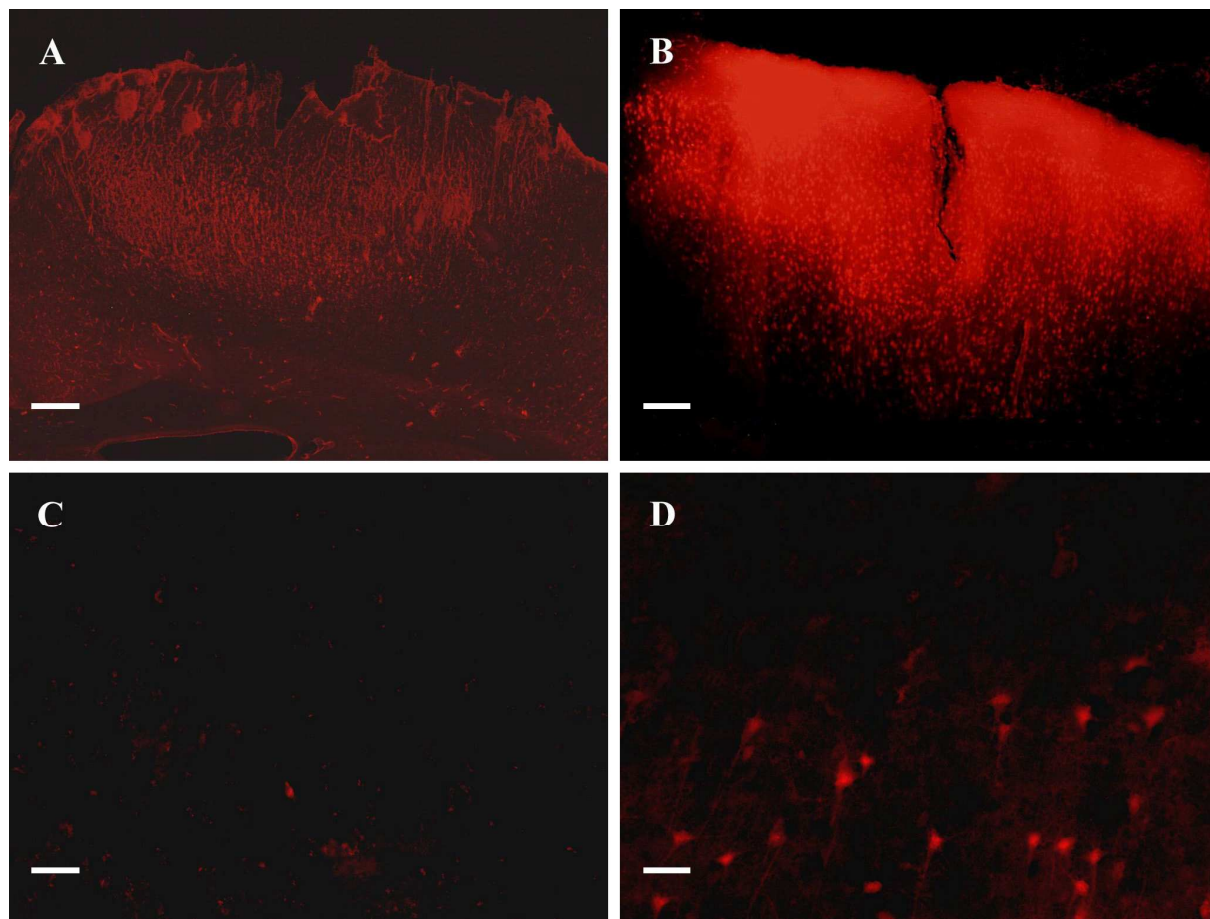
**5. ábra:** Hideg lézió patkányagy elsődleges motoros kérgén. A: TTC-festéssel vizualizált léziós terület. Az elsődlegesen károsodott kérgi terület fehér színnel jelenik meg, mely jól láthatóan elkülönül az ép, vörösre festődő területektől. B: Evans Blue beadása után az elsődlegesen károsodott kérgi terület (mag régió) és a körülötte levő ún. penumbra régió (szaggatott vonallal jelölve). A penumbra régióban vörös pontokként jelennek meg a sérült sejtek. Kalibráció: (A) 1000  $\mu\text{m}$ ; (B) 200  $\mu\text{m}$ .



**6. ábra:** Evans Blue-jelölt sejtek a penumbra régióban nagyobb nagyításnál (400x-os nagyítás). Megfelelő nagyítás mellett a sejteken elkülöníthetők az apikális (vékony nyíl) és bazális (vastag nyíl) dendritiek. Kalibráció: 50  $\mu\text{m}$ .

### **Az agyszövet autofluoreszcenciája**

Az EB-festés alkalmazásánál nem hagyhatjuk figyelmen kívül a szöveti komponensek autofluoreszcenciáját, mely hozzáadódik a kísérleteinkben detektálható fluoreszcenciához. Ennek kivédésére kontroll sorozatot készítettünk olyan állatokkal, melyek a hideg lézió kiváltását követően fiziológiás sóoldatot kaptak. Ezen csoport állataiból származó metszeteket ugyanolyan gerjesztési és emissziós paraméterek mellett vizsgáltuk. Mind a EB-jelölt, mind a fiziológiás sóoldattal kezelt csoport esetében a háttér fluoreszcencia kontrollját a szeletek lézióban nem érintett, kontralaterális féltekéjének képe jelentette. Külön mikroszkópos felvételeket készítettünk az EB-kezelt és fiziológiás sóoldattal kezelt állatok lézióban érintett és érintetlen agyféltekéjéről. Az ép oldal szöveti autofluoreszcenciáját kivontuk a lézionált oldal fluoreszcenciájából. A fiziológiás sóoldattal kezelt csoport esetében a kivonást követően nem volt elkülöníthető fluoreszcens jelölődés a szeletekben. Ezzel szemben az EB-kezelt állatokból készült metszeteken a kivonást követően is megfigyelhetők voltak jelölődött neuronok (7. ábra).



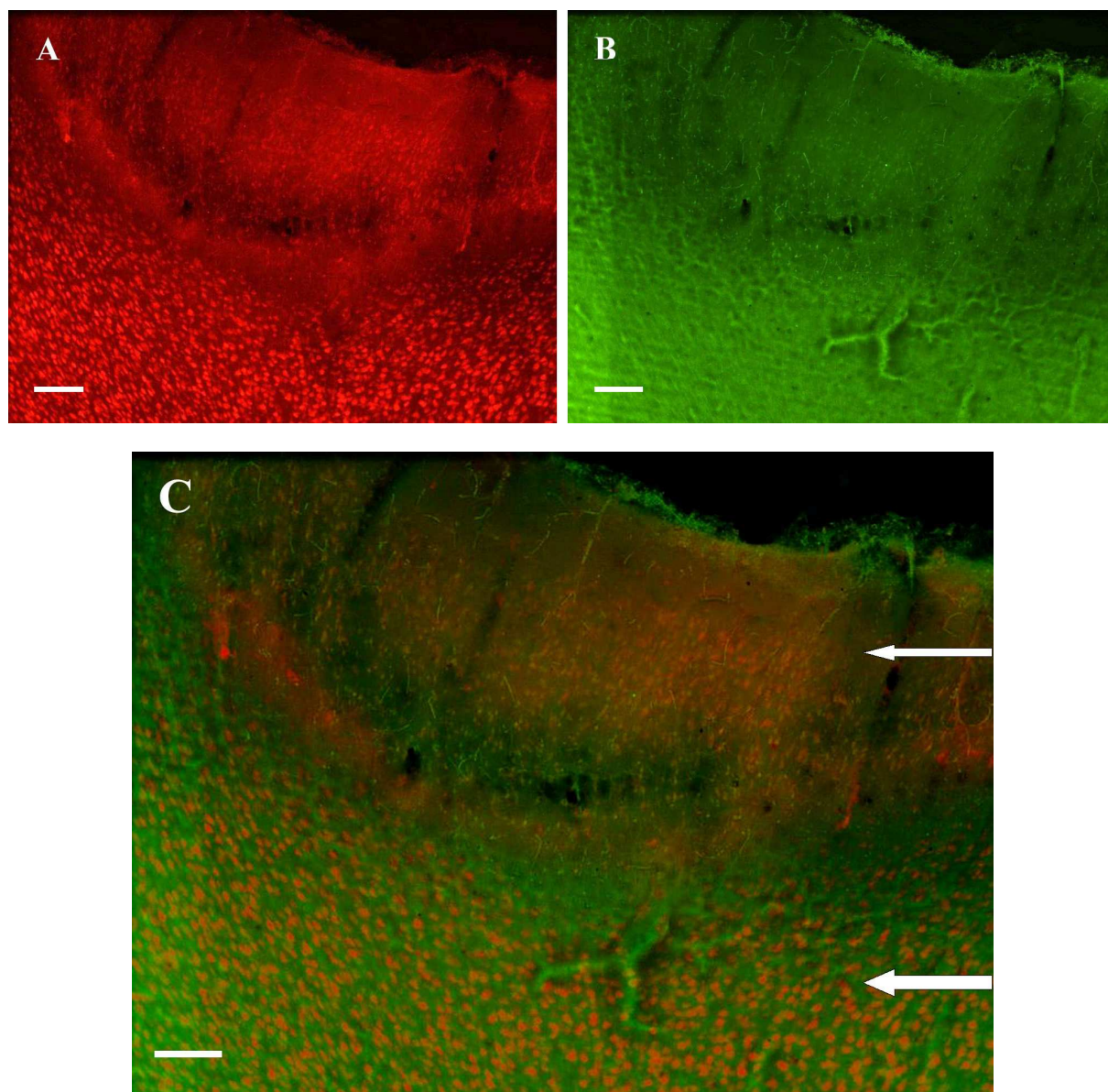
7. ábra: Evans Blue-jelölt szövetek fluoreszcenciájának korrekciója, az autofluoreszcencia figyelembe vételével. EB beadását követően vörös színnel jelenik meg a léziós terület (B). Fiziológias sóoldattal kezelt állatoknál szintén detektálni tudtuk az agy szövetének fluoreszcenciáját (A). Mindkét csoport esetében a lézióban nem érintett oldal jelentette a háttér fluoreszcencia kontrollját, melyet kivontunk a léziós oldalról készített képből. A kivonást követően a fiz. sóoldattal kezelt állatoknál lényegében nem lehetett jelölődést elkülöníteni (C), összehasonlítva az EB-kezelt csoporttal, ahol továbbra is megfigyelhetők voltak az EB-jelölt sejtek a penumbra régióban (D). Kalibráció: (A, B) 200 $\mu$ m; (C,D) 50 $\mu$ m.

### 6.1.2 NeuN és Fluoro-Jade B kettős festés

A hideg lézióknak kitett állatok egyik csoportjánál azt vizsgáltuk, hogy a sérült, de még élő és a már visszafordíthatatlanul károsodott sejtek milyen módon oszlanak el a trauma által érintett területen. Ugyanarról a metszetről készített mikroszkópos felvételeknél jól látható a degenerálódott neuronokat jelző FJB-pozitív sejtek és az élő, NeuN-pozitív sejtek eloszlása. A FJB-pozitív sejtek a léziós terület mag régiójában nagy számban vannak jelen, a penumbra régió felé haladva denzitásuk egyre csökken. Ezzel ellentétes a NeuN-pozitív sejtek eloszlása.



Megfigyelhető hogy a léziót követő negyedik órában még vannak élő sejtek a mag régióban is és számuk a penumbra régiója felé haladva fokozatosan nő (8. ábra).



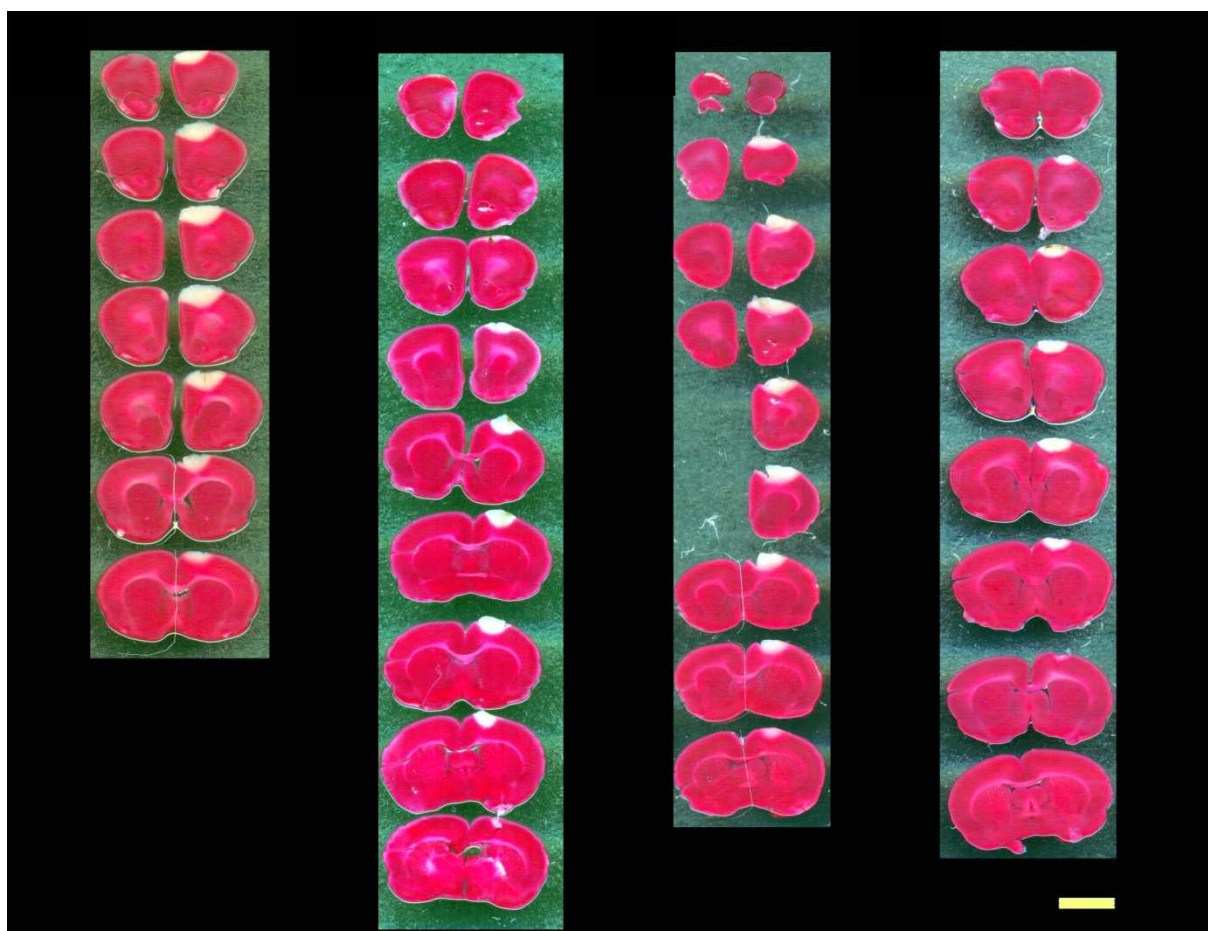
8. ábra: Élő és degenerálódott neuronok megoszlása a lézióban érintett kérgi területen. Az élő sejteket jelölő NeuN-pozitív sejtek a penumbra régióban detektálhatók nagy számba, számuk a mag régió felé haladva csökken (A). A Fluoro-Jade B-pozitív sejtek eloszlása az előzőekkel ellentétes: denzitásuk a mag régió felé haladva nő (B). A két festési eljárást egy képen egyesítve egyszerre figyelhetők meg az élő és degenerálódott neuronok (C). Vékony nyíl: mag régió, vastag nyíl: penumbra régió. Kalibráció: (A, B, C) 200  $\mu\text{m}$ .

### 6.1.3 DHEAS- és $E_2$ kezelés hatása

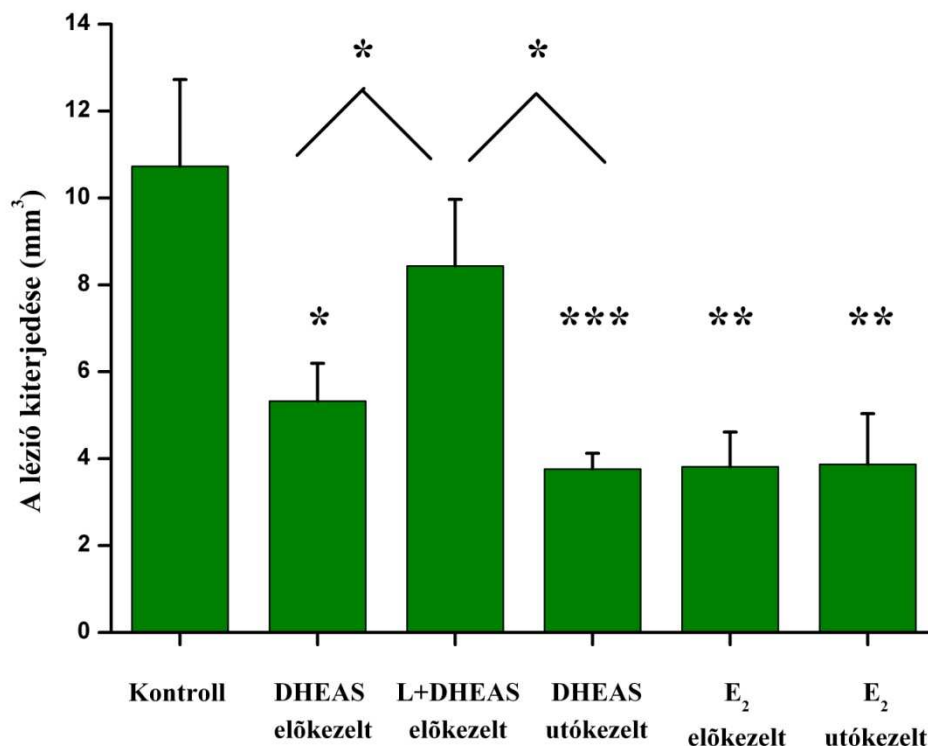
A hideg lézióban érintett terület nagyságát hat, különböző módon kezelt csoportban vizsgáltuk. A TTC-festés során fehéren maradt területeket mértük le, majd csoportonként

meghatároztuk a sérült régió térfogatát (9. ábra). A kontroll csoport esetében bizonyult a lézió kiterjedése a legnagyobbnak ( $10,173 \pm 1,993 \text{ mm}^3$ ). A DHEAS kezelés mind elő- ( $5,324 \pm 0,869 \text{ mm}^3$ ), mind utókezelt ( $3,760 \pm 0,362 \text{ mm}^3$ ) formában csökkentette a károsodás mértékét. A változás már az előkezelésnél szignifikáns mértékű volt, azonban az utókezelés még hatékonyabbnak bizonyult a sérülés kiterjedésének csökkentésében. A DHEAS előkezelés hatását a letrozole kezelés megszüntette ( $8,436 \pm 1,532 \text{ mm}^3$ ): a letrozole és a DHEAS együttes adására a lézió kiterjedése majdnem elérte a kontroll csoportnál mérhető nagyságot.

Az  $E_2$ -kezelésnek hasonló hatása volt a lézió kiterjedésére - akár a lézió kiváltása előtt ( $3,814 \pm 0,797 \text{ mm}^3$ ), akár utána kapták ( $3,872 \pm 1,166 \text{ mm}^3$ )- mindkét esetben szignifikánsan csökkentette a lézió kiterjedését (10. ábra).



**9. ábra:** Léziós terület vizualizálása TTC-festéssel. A károsodott régió teljes terjedelméből készített szeletekről scannelt felvételek, kontroll (A)  $n=6$ , DHEAS-előkezelt (B)  $n=11$ , letrozole+ DHEAS-előkezelt (C)  $n=5$ , DHEAS-utókezelt (D)  $n=14$  állatoknál. Kalibráció: 5 mm.



10. ábra: Összefoglaló diagram a lézió kiterjedésének változásáról a DHEAS- és E<sub>2</sub> elő-, valamint utókezelést kapott csoportok esetében. A károsodott területek kiterjedéseinek átlagait határoztuk meg és hasonlítottuk össze. A DHEAS és E<sub>2</sub> kezelés mind elő-, mind utókezelés formájában egyaránt szignifikánsan csökkentette a lézió térfogatát a kontroll csoporthoz képest. Abban az esetben, amikor a DHEAS kezelést letrozole beadása előzte meg a lézió kiterjedése nem mutatott szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz viszonyítva. Szignifikáns különbség mutatkozott azonban a letrozole+DHEAS-előkezelt csoport valamint a DHEAS utókezelt és DHEAS előkezelt csoport átlagai között. Az átlagokat átlag  $\pm$  S.E.M.-ben adtuk meg. \*,  $P < 0,05$ , \*\*,  $P < 0,01$ , \*\*\*,  $P < 0,001$  (ANOVA). L: letrozole. Kontroll csoport,  $n=6$ ; DHEAS előkezelt csoport,  $n=1$ ; L+DHEAS csoport,  $n=5$ ; DHEAS utókezelt csoport,  $n=5$ ; E<sub>2</sub> előkezelt csoport,  $n=7$ ; E<sub>2</sub> utókezelt csoport,  $n=8$ .

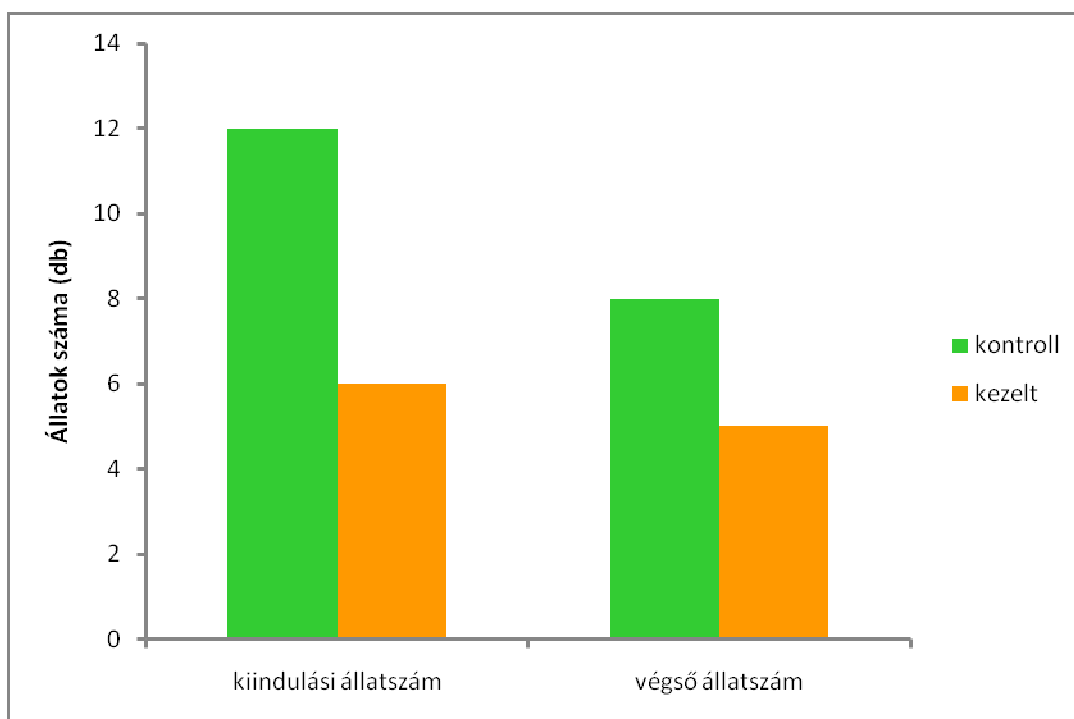


## 6.2 Stroke modell

### 6.2.1 Oxálecetsav hatása fototrombotikus lézióban

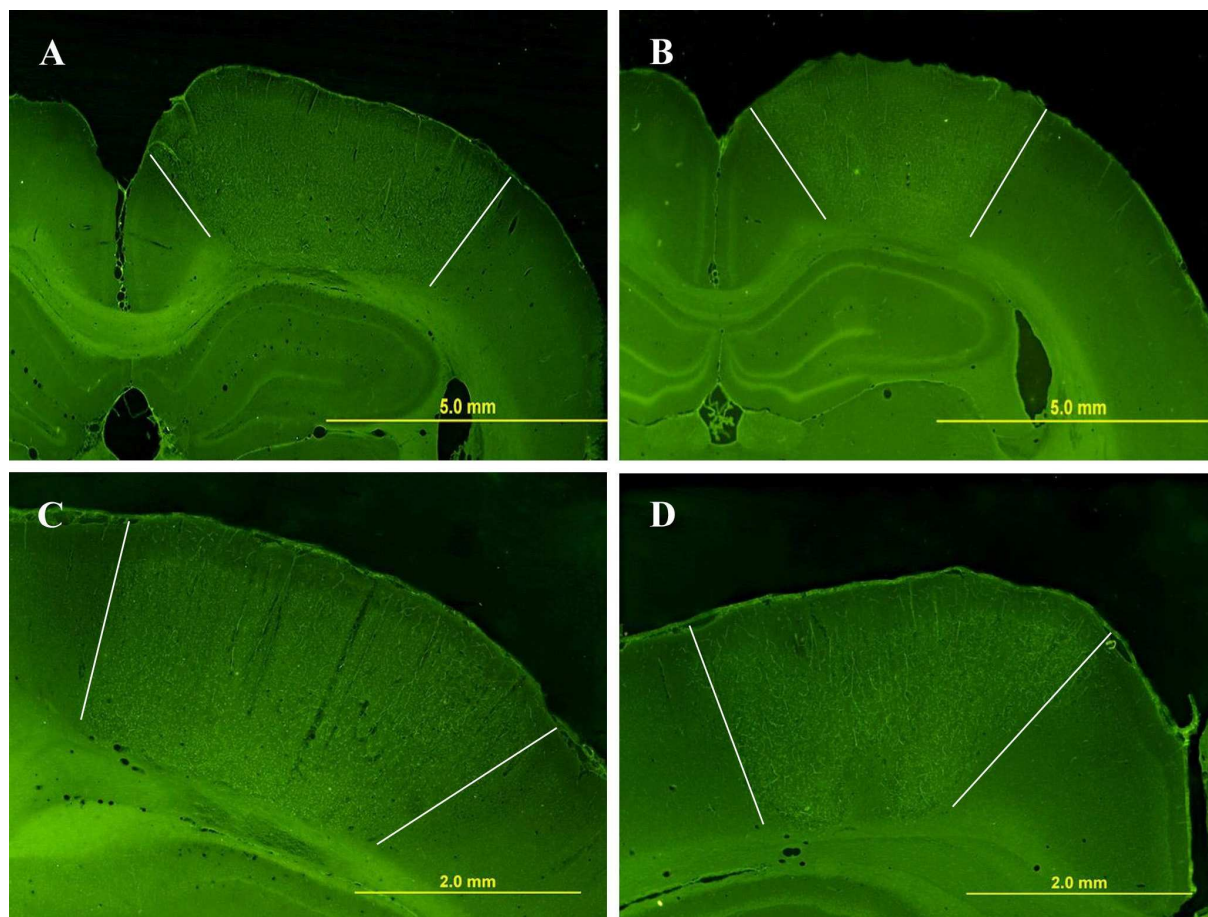
Stroke modellünkben fototrombotikus léziót hoztunk létre az elsődleges szomatoszenzoros kérgi területen és FJB-festést alkalmaztunk az érelzáródás következtében kialakuló ischémiás terület nagyságának, illetve a degenerálódott neuronok számának meghatározására. Egy potenciális neuroprotektív eljárás, az oxálecetsav intravénás adását tanulmányoztuk az ischaemia modellen. A szövettani vizsgálatokat megelőzően már egy igen lényeges különbség mutatkozott a kontroll és OxAc-kezelést kapott csoportok között. OxAc-kezelést nem kapott csoport állatainak a túlélése rosszabb arányt mutatott a lézió kialakítását követően. Ebben a csoportban az állatok közel fele már a perfundálás előtt elpusztult. A kezelt csoportban a halálozás ennél jóval kisebb arányban fordult elő.

Nevezetesen, az oxálecetsav kezelést nem kapott állatok (kontroll) 66 %-a, míg a kezelt állatok 83 %-a élte túl a 4 órás túlélési időt (11. ábra).

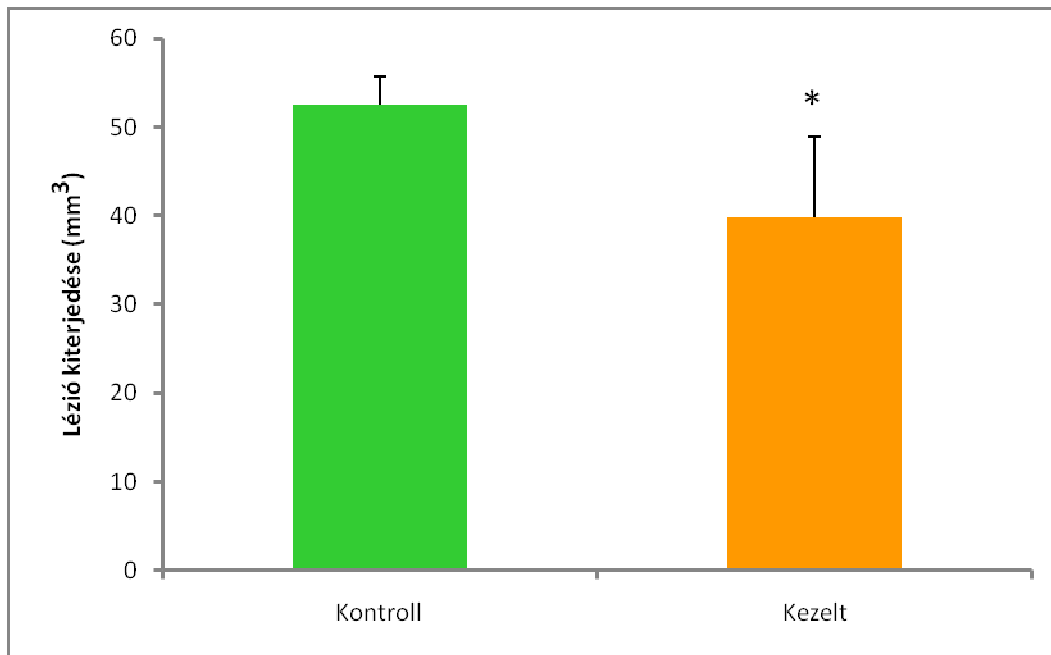


11. ábra: Állatok túlélése a kontroll és oxálecetsavas kezelést kapott csoportokban. A kontroll csoport állatainak túlélése rosszabb arányt mutatott, mint az OxAc-kezelést kapott csoport állatainak túlélése.

A szövettani vizsgálatokban is jelentős eltérések mutatkoztak a két csoport között. A mikroszkópos felvételeken lemért területekből meghatároztuk a lézió kiterjedését ( $\text{mm}^3$ ), de a finomszerkezeti eltérések is jól láthatók a különböző nagyítású (40x-es és 100x-os nagyítás), reprezentatív felvételeken (12. ábra). Az ischaemiás terület kiterjedése szignifikánsan kisebb volt az OxAc-kezelést kapott állatoknál ( $52,45 \pm 3,25$  vs  $39,76 \pm 9,21 \text{ mm}^3$ ), azaz az OxAc-kezelés kb. 30%-kal csökkentette az ischaemiás terület kiterjedését (13. ábra).



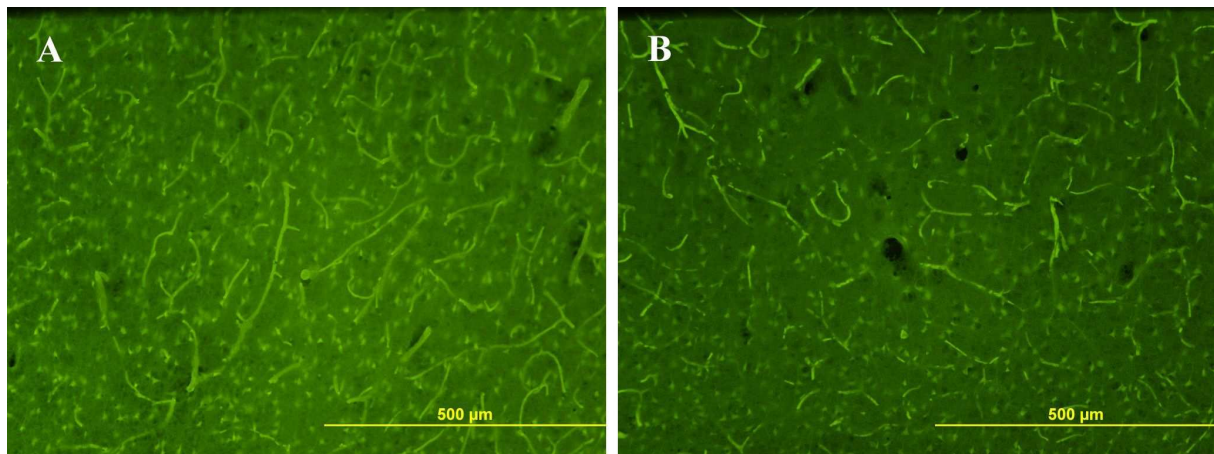
**12. ábra:** Kontroll és OxAc-kezelést kapott állatok agyából készített metszetek reprezentatív mikroszkópos felvételei. 40x-es nagyítású mikroszkópos felvételek a fototrombotikus lézió kiterjedéséről kontroll (A) és kezelt (B) csoportok esetében, valamint 100x-os nagyítású felvételek kontroll (C) és kezelt (D) állatokból származó szeletekről.



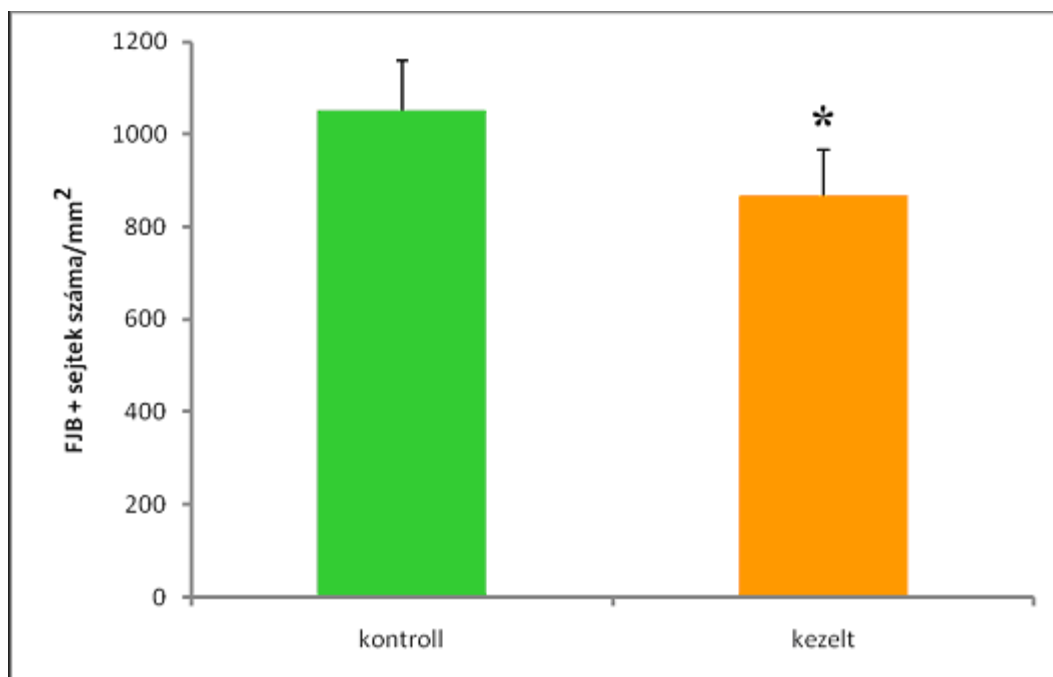
**13. ábra:** A fototrombotikus lézió kiterjedése kontroll és OxAc-kezelést kapott állatoknál. OxAc-kezelés hatására szignifikánsan csökkent a lézió térfogata a kontroll csoporthoz képest. Az adatokat átlag  $\pm$  S.D.-vel adtuk meg, páratlan T-teszt, \* $P < 0,05$ , kontroll csoport,  $n=8$ ; kezelt csoport,  $n=5$ .

Nagyobb nagyítású felvételeken (200x-os nagyítás) elkülöníthetővé váltak a FJB-pozitív sejtek (14. ábra). A mikroszkópos felvételeken leszámoltuk a FJB-pozitív sejteket és területegységre vonatkoztatva (mm<sup>2</sup>) meghatároztuk a számukat. Az OxAc-kezelést kapott csoportnál szignifikánsan csökkent a FJB-pozitív sejtek száma ( $1051,75 \pm 106,82$  vs  $867,75 \pm 99,17$  db/mm<sup>2</sup>). Az OxAc-kezelés ez esetben is kb. 30%-kal csökkentette a jelölődött sejtek számát (15. ábra).

A nagyobb nagyítású felvételeken a FJB-pozitív sejtek mellett, mindkét csoport esetében megfigyelhetők jelölődött kapillárisok. Az OxAc-kezelést nem kapott állatok agyából készített metszeteken a kapillárisok intenzíven és hosszabb szakaszokon folyamatosan jelölődnek. A kezelésben nem részesült állatoknál a kapillárisok jelölődése szaggatottabb képet mutat.



14. ábra: Fluoro Jade B-pozitív sejtek kontroll (A) és OxAc-kezelést (B) kapott állatok agyából készített metszeteken. 200x-os nagyítású reprezentatív mikroszkópos felvételek.



15. ábra: Fluoro-Jade B-pozitív sejtek száma területegységre vonatkoztatva. Az OxAc-kezelés szignifikánsan csökkentette a degenerálódott neuronokat jelző FJB-pozitív sejtek számát a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az adatokat átlag  $\pm$  S.D.-vel adtuk meg, páratlan T-teszt, \* $P < 0,05$ , kontroll csoport,  $n=8$ ; kezelt csoport,  $n=5$ .

## 7. DISZKUSSZIÓ

A hideg léziós modell elfogadott és széles körben alkalmazott módja az agyat ért sérülések tanulmányozásának, valamint klasszikus módszere a vasogén agyödéma modellezésének. A trauma az elsődlegesen kialakult kérgi nekrosis mellett további elváltozásokat okoz az agyban. Ezeket az időben később megjelenő patofiziológiai jelenségeket másodlagos károsodásokként definiálták, melynek fogalmát az 1970-es években írták le először (Jennett 1970). A fogalom igen összetett, magába foglalja az acidózist, az serkentő neurotranszmitterek okozta excitotoxicitást, a szabad gyökök fokozott felszabadulását és az apoptózis folyamatát (Meldrum és Garthwaite 1990; Hovda és mtsai., 1992; Murakami és mtsai., 1997). A másodlagos károsodások jelentőségét az adja, hogy a kialakulásukban szerepet játszó folyamatok megelőzésével számottevően csökkenthető az idegsejtek pusztulása, a szöveti állomány megmentése pedig a neurológiai funkciók jelentős javulását eredményezheti. További másodlagos szöveti károsodást okoz a vasogén agyödéma kialakulása, mely a vér-agy gát károsodásának a következménye (Murakami és mtsai., 1999; Gorlach és mtsai., 2001). A vér-agy gát integritásának megváltozását Evans Blue (EB) beadásával lehet nyomon követni, mivel az EB szérum albuminhoz kötődve jelzi, hogy a vér-agy gát hol sérül (Wolman és mtsai., 1981). Korábban elvégzett kísérletekben az EB beadását követően az agyat homogenizálták, majd spektrofotometriás módszerrel mérték meg az agyszövet EB tartalmát (Ikeda és mtsai., 1994; Murakami és mtsai., 1999). Murakami és munkatársai ezzel a módszerrel határozták meg az EB-tartalom időbeli változását hideg lézió kialakítását követően (Murakami és mtsai., 1997). Mivel az EB tartalom a beadást követően fél órával éri el a maximumát a sérült féltekében, ezért a festéket a perfundálás előtt fél órával adtuk be. Újszerű megközelítést jelent, hogy kísérleteinkben a hideg lézióban érintett agyi régióból metszeteket készítettünk és az EB fluoreszcens tulajdonságait kihasználva, mikroszkóppal vizsgáltuk a lézió kiterjedését. Az eltérő túlélési idejű állatcsoportoknál tapasztalt különbségek alátámasztják azon korábbi megfigyeléseket, melyek a lézió térbeli terjedését írták le az idő függvényében (Eriskat és mtsai., 1994). Ezen megfigyelések és saját tapasztalataink alapján választottuk a négy órás túlélési időt. Ez az időtartam elegendőnek bizonyult más modellekben a sejt sérülését jelző korai markerek (pl. Hsp 70) expressziójának detektálásához (Pavlik és mtsai., 2003). A FJB- és NeuN-festés együttes alkalmazásával nyomon követhető az élő NeuN-pozitív sejtek és a degenerálódott neuronokat jelző FJB-pozitív sejtek eloszlása a lézió területén négy órával az inzultust követően. A FJB-pozitív

sejtek száma a lézió mag régiójában a legnagyobb, attól távolodva fokozatosan csökken. A NeuN-sejtek ezzel ellentétes eloszlása mutatja, hogy a mag régiótól távolodva, a penumbra területén kedvezőbbek a túlélési esélyek. Az idő előrehaladtával azonban a penumbra is irreverzibilisen károsodik, ezt jelzi a nyolc-, illetve 12 órás túlélésű állatoknál az érintett szövetállomány fokozódó mértékű kiszakadása. A primer károsodást mutató területtel szomszédos penumbrára tehát az órákkal-napokkal később bekövetkező sejthalál jellemző (Hovda és mtsai., 1992). Ez a környező határsáv jelenti a neuroprotektív beavatkozások fő célpontját, ezért volt fontos, hogy ez a régió minél rövidebb idő alatt meghatározható legyen. Régóta ismeretes, hogy TTC-festéssel az elsődlegesen károsodott agyi régiók láthatóvá tehetők (Coyle 1987). A TTC-festés azonban ebben az esetben nem bizonyul megfelelő módszernek, mert alkalmazásával a kérdéses terület nem azonosítható megbízhatóan. Habár ezzel a módszerrel is kimutatható egy halványan festődő átmeneti zóna a nem-festődő mag régió és a vörös színű élő parenchyma között, de ez valószínűleg az ödéma és nem a sejtkárosodás következménye. Ezzel ellentétben az EB-festésnél az elsődlegesen károsodott kérgi területtel szomszédos penumbra régiója jól azonosíthatóan jelenik meg. Az EB-fluoreszcencián alapuló módszernél azonban számolni kell egy lehetséges problémával, amely a szövetek nem specifikus (auto)fluoreszcenciájából származik. Különösen lényeges lehet ez a jelenség, ha kvantitatív vizsgálatok végzése a cél. A megoldást Murphy és Lever szolgáltatta, egy olyan módszert publikáltak, mellyel kiküszöbölhetővé vált az autofluoreszcenciás jel (Murphy és Lever 2002). Ezt a módszert alkalmazva egyértelműen azonosíthatóvá válnak azok a sejtek, melyek a membránjuk károsodásának következtében felveszik az érpályából kiszabadult EB-t. A fokális agyi sérülésekben érintett sejtek felismerhetőek bizonyos gének expressziójának megváltozásáról is, illetve a változások okozta anyagcserezavarokról és a késleltetett sejthalálról (Hayes és mtsai., 1995; Hermann és mtsai., 2004). A sejtek azonosításához széles körben alkalmazott markerek: *activator protein-1*, c-jun és a mitogén aktivált protein kináz foszfatáz-1 (mkp-1) (Hata és mtsai., 2000), illetve a kaszpáz-3 *de novo* expressziója is közrejátszik a sérülés kialakulásában és így megfelelő markere az apoptózis kimutatásának (Hermann és mtsai., 2004). Ellentétben ezekkel az immuncitokémiai módszerekkel, az erekből kilépő EB detektálásával rövidebb idő alatt lehet azonosítani a penumbra területét, azaz már négy órával a traumát követően is. Habár régóta ismert, hogy a károsodott neuronok és az idegrendszer alkotó egyéb sejtek felveszik az EB-t (Sasaki és Schneider 1976), elsőként mutattunk ki jelölődött piramis sejteket, melyek jól felismerhetők

apikális és bazális denritjeikről. A módszer hasznosnak bizonyult azokban az esetekben is, amikor potenciális neuroprotektív hatású molekulákat, anyagokat teszteltünk (Juhász-Vedres és mtsai., 2006). További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy pontosan milyen sejtek veszik fel az EB-t: apoptotikus, nekrotikus vagy degenerálódott, azaz halott vagy subletálisan károsodott sejtek.

Trauma modellünkön vizsgáltuk a DHEAS hatását, mind előkezelés, mind utókezelés formájában, melyet összehasonlítottunk a hasonló módon alkalmazott  $E_2$ -kezelés eredményeivel. Eredményeink azt mutatják, hogy a DHEAS-nal történt elő- és utókezelés egyaránt csökkenti a károsodott terület kiterjedését. Több vizsgálat igazolta a DHEAS neuroprotektív hatását különböző modelleken, habár a hatás hátterében álló celluláris és molekuláris mechanizmusok egyelőre még nem teljesen tisztázottak (Kimonides és mtsai., 1998; Lapchak és mtsai., 2000). Korábbi kísérletek alapján arra lehet következtetni, hogy a neuroszteroidok elsősorban membrán-kötött receptorok allosztérikus szabályozásával képesek kifejteni neuroaktív hatásukat (Majewska és mtsai., 1986; Wu és mtsai., 1991; Maurice 2002). Elsőként a  $GABA_A$ -receptor került a neuroszteroidokkal kapcsolatos kutatások középpontjába. Számos kísérlet igazolta, hogy a DHEA és DHEAS pozitív allosztérikus szabályozója a  $GABA_A$ -receptoroknak, mivel növelik az ioncsatorna nyitódásának frekvenciáját, valamint időtartamát (Majewska 1992; Paul és Purdy 1992; Lambert és mtsai., 1995; Rupprecht és Holsboer 1999). Ezt az elképzelést támasztotta alá Lapchak és munkatársainak megfigyelése, miszerint a  $GABA_A$ -receptor antagonistá bicucullin megszünteti a DHEAS neuroprotektív hatását (Lapchak és mtsai., 2000). Kimonides és munkatársai ugyanakkor kimutatták, hogy mind a DHEA, mind a DHEAS mérsékelni tudja az NMDA-indukálta sejtpusztulást a hippocampus CA1 és CA2 régiójában, valamint a DHEAS bizonyos neuronális populációkat véd a neurotoxikus inzultusoktól (Kimonides és mtsai., 1998; Mao és Barger 1998). A legújabb kutatások eredményei felvetették, hogy a DHEA és egyéb neuroszteroidok nem csak transzmitter-aktivált ioncsatornákon keresztül képesek szabályozni a neuronális funkciókat, hanem a génexpresszió módosításával is (Racchi és mtsai., 2001; Fontaine-Lenoir és mtsai., 2006).

Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a DHEAS neuroprotektív hatását a letrozole kezelés megszüntette. A letrozole egy aromatáz inhibitor, ami blokkolja a  $DHEA \rightarrow \text{tesztoszteron} \rightarrow 17\beta\text{-ösztadiol}$  átalakulást (Rupprecht és Holsboer 1999). Megfigyeléseink alapján arra következtettünk, hogy a DHEAS részlegesen vagy teljesen  $E_2$ -

vé alakul, ami feltehetőleg a neuroprotektív hatást közvetíti. Az E<sub>2</sub> neuroprotektív hatását korábban már kimutatták agyban (Wise és mtsai., 2000; Garcia-Segura és mtsai., 2001; Wise és mtsai., 2001; Yang és mtsai., 2003). Az E<sub>2</sub> ezen hatásmechanizmusa még nem tisztázott, habár néhány kutató felvetette, hogy az E<sub>2</sub> neuroprotektív hatása azon alapul, hogy gátolja az apoptózis folyamatát, elsősorban a Bcl-2 expresszió szabályozásán keresztül (Garcia-Segura és mtsai., 1998; Singer és mtsai., 1998; Dubal és mtsai., 1999). Számos eredmény született, amely az ösztrogén-receptor- $\alpha$  szerepét bizonyította a E<sub>2</sub>-közvetítette neuroprotektációban (Dubal és mtsai., 2001; Cordey és Pike 2005). Eredményeink Hajsán és Veiga megfigyelésével összhangban állva felvetik, hogy a DHEA és DHEAS aromás átalakulása az agyban történik (Veiga és mtsai., 2003; Hajsán és mtsai., 2004), ami lehetőséget teremt hormonhelyettesítő terápiák használatára mindazon mellékhatások nélkül, melyek a szisztémás ösztrogén adását kísérik (Beral 2003). A neuroszteroidokról ismert, hogy fontos szerepet játszanak a neocortex szerveződésében a neuronális fejlődés alatt, valamint elősegítik a neuronális újjáalakulást (Roberts és mtsai., 1987; Compagnone és Mellon 1998; Rao és Kolsch 2003). Maclusky és munkatársai a DHEA-által indukált szinaptogenezist gátolni tudták letrozole adásával kizárólag nőstény állatokban (MacLusky és mtsai., 2004). Ezzel ellentétben, vizsgálataink során hím patkányokban mutattuk ki a DHEAS letrozole-függő neuroprotektív hatását. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a DHEA és DHEAS neuroprotektív-, valamint a szinaptogenezisre gyakorolt hatása eltérő módon szabályozódik a két nemben. Ez a jelenség azonban további vizsgálatokat kíván. A hideg léziós modell a legáltalánosabban alkalmazott módszer a vazogén agyödéma tanulmányozására (Murakami és mtsai., 1999). Vizsgálataink szempontjából azért van ennek jelentősége, mert kísérletesen igazolták a DHEAS neuroprotektív hatását a vér-agy gát integritásának fenntartásában (Losem-Heinrichs és mtsai., 2004), valamint az E<sub>2</sub> az endotheliális NOS-3 expressziójának indukálásával szintén fontos szerepet játszik az endothelsejtek védelmében (Foresti és Motterlini 1999). Ezen hatásaik révén a neuroszteroidok védik az idegsejteket a további károsodásoktól a poszttraumás periódusban. Különösen fontos lehet a DHEAS terápiás alkalmazásának szempontjából, hogy még az egyszeri poszttraumás DHEAS adása is neuroprotektívnek bizonyult a kísérleteinkben. Hasonló pozitív eredményt mutattak azok a kísérletek, melyben a DHEAS utókezelést gerincvelői ischaemia modellen tesztelték (Lapchak és mtsai., 2000). Bár kísérleteinkben viszonylag rövid, 1 órás túlélési időt hagytunk, a terápiás időablak hosszabb is lehet. Yang az E<sub>2</sub> neuroprotektív hatását az ischaemiás



inzultust követően 3 órával mutatta ki (Yang és mtsai., 2000). Megfigyeléseink egyértelműen mutatják, hogy a DHEAS neuroprotektív hatású mind elő-, mind utókezelés formájában, a protekció mértéke az E<sub>2</sub>-éhez hasonló, ennek következtében a DHEAS-nak értékes terápiás szerepe lehet.

Stroke modellünkben fototrombotikus léziót idéztünk elő patkányok elsődleges szomatoszenzoros kérgén. Az érelzáródás következtében kialakuló ischaemiás terület kiterjedését, illetve a degenerálódott neuronok számát határoztuk meg területegységre vonatkoztatva. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az intravénásan (i.v.) adott oxálecetsav (OxAc) milyen módon képes befolyásolni a fenti paramétereket. Az OxAc-ról ismert, hogy a vérben glutamát-oxálcetát transzamináz enzim jelenlétében 2- $\alpha$ -ketoglutaráttá és aszpartáttá képes alakítani a glutamátot, melynek koncentrációja így lecsökken a vérplazmában (Gottlieb és mtsai., 2003). A folyamat eredményeképpen megváltozik az agy extracelluláris folyadéka és a vérplazma közötti Glu koncentrációgrádiens és az ilyen módon megváltozott koncentráció viszonyok sokszorosára növelhetik a Glu agyból vérbe történő kiáramlásának sebességét (Gottlieb és mtsai., 2003). Az OxAc Glu-koncentráció csökkentő hatásának azért van nagy jelentősége, mert a neurológiai kórképek jelentős hányadában az agyban megnő az extracelluláris Glu koncentráció, ami az idegsejtek pusztulását okozza (Choi és Rothman 1990; Yamamoto és mtsai., 1999; Gopinath és mtsai., 2000). A Glu sejtpusztulásban betöltött központi szerepét hangsúlyozzák azok a vizsgálatok is, melyekben Glu-receptor antagonistákkal szignifikánsan csökkenteni tudták az ischaemiás károsodást (Kharlamov és mtsai., 1996; Bordi és mtsai., 1997; Umemura és mtsai., 1997; Stieg és mtsai., 1999). Ezzel a kezelési móddal tehát mérsékelhető a Glu neuronokra gyakorolt excitotoxicitása, vagyis az i.v. adott OxAc hozzájárul a fiziológiás Glu koncentráció viszonyok kialakításához az agy extracelluláris folyadékterében. Az OxAc neuroprotektív hatását traumás agyi sérülések esetében már bizonyították (Zlotnik és mtsai., 2008; Zlotnik és mtsai., 2009). Elsőként vizsgáltuk az OxAc hatását agyi ischaemiás modellen. Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy az intravénásan adagolt OxAc szignifikánsan (kb. 30%-kal) csökkenti a FJB-festéssel láthatóvá tett ischaemiás terület nagyságát. Mikroszkópos vizsgálataink során, nagyobb nagyítás mellett meghatároztuk a degenerálódott neuronokat jelentő FJB-pozitív sejtek számát is területegységre vonatkoztatva. Ebben az esetben is kimutatható volt az OxAc-kezelés neuroprotektív hatása, mert a kezelés következtében kb. 30%-kal csökkent a jelölődött sejtek száma. Az OxAc ezen hatásai már négy órával a lézió kialakítását követően kimutathatóak

voltak. Ez a viszonylag rövid, léziót követő időtartam az OxAc és pyruvát hatásmechanizmusát vizsgáló korábbi kísérletekben is elegendőnek bizonyult a neuroprotektív hatás kifejeződéséhez (Zlotnik és mtsai., 2007; Zlotnik és mtsai., 2008). Kísérletünkben az OxAc neuroprotektív tulajdonsága legnyilvánvalóbb módon abban mutatkozott meg, hogy az OxAc kezelést kapott állatok jóval nagyobb arányban éltek túl a lézió kialakítását követően. Az OxAc-kezelést nem kapott állatok csoportjának közel fele már a perfundálást megelőzően elpusztult, így ezek az állatok már nem vettek részt a szövettani vizsgálatokban. Mikroszkópos felvételeinken jól látható, hogy a degenerálódott neuronok mellett a kapillárisok is fluoreszkálnak. Ez a jelenség azért meglepő, mert a FJB-ről jól ismert, hogy az anionos fluoreszcein származékok egy újabb képviselője, mely a korábban alkalmazott Fluoro-Jade-hoz képest még nagyobb affinitással és kontraszttal, szelektíven jelöli a degenerálódott neuronokat (Schmued és Hopkins 2000). A kapillárisok jelölődése feltételezéseink szerint nem a FJB festésnek köszönhető, hanem a vörösvértestek megváltozott fluoreszcenciájának. Modellünkben a fototrombotikus léziót Rose Bengal keringésbe juttatásával váltottuk ki. A Rose Bengal fény hatására reaktív oxigéngyökök képződését generálja, melyek károsítják a kapillárisok endotheliumát, a vér alakos elemeit, valamint előidézik a thrombus kialakulását (Pooler és Valenzano 1981; Watson és mtsai., 1985; Wright és mtsai., 2003). A vörösvértestek peroxidációja a fluoreszcenciájuk megváltozását is előidézi, ami kapcsolatban áll a hem molekula degradációjával (el-Rahman és mtsai., 1995; Nagababu és Rifkind 1998; Nagababu és Rifkind 2004). A vörösvértestek ilyen módon megváltozott spektrális tulajdonságai majdnem megegyeznek a FJB gerjesztési és kibocsátási paramétereivel, ami miatt a kapillárisok is láthatóvá válnak a mikroszkópos felvételeken. Összehasonlítva a két metszetet, amely a OxAc kezelést kapott és OxAc kezelésben nem részesült állatok agyából készült, jól látható, hogy a kezelt állatok agyról készült felvételeken a kapillárisok jelölődése szaggatottabb. Megfigyelésünkből arra következtetünk, hogy ebben a csoportban az agyi perfúzió fokozottabb volt a kezelést nem kapott csoporthoz képest. Ennek a felvetésnek a pontos tisztázására az agyi perfúzió konkrét vizsgálata szükséges. Az ischaemia patomechanizmusának pontos ismeretében könnyen összefoglalhatóak az OxAc neuroprotektív tulajdonságai. A vérellátási zavar miatt kialakuló energiakrízis következményes Glu felszabadulását okoz. A Glu ioncsatornákra és enzimekre hatva kaszkádfolyamatot indít be, amely végül a sejtek pusztulásához vezet. A Glu közvetett módon ödéma kialakulást is előidézi. Mindezek alapján elmondható, hogy az i.v. adott OxAc

Glu scavengerként hatva a vérben, fokozza az agy → vér irányú Glu transzportot, lényegesen mérsékelve ezzel a Glu excitotoxikus hatását. Mindez azt eredményezte, hogy csökkent az károsodott agyi terület mérete, a sérült sejtek száma, mérséklődött az ödéma, javult, a szöveti perfúzió, növekedett a szövet oxigénellátottsága, valamint csökkent az ischaemia indukálta további károsodás. Kutatócsoportunk azóta további adatokkal szolgált az OxAc neuroprotektív hatását illetően (Marosi és mtsai., 2009; Nagy és mtsai., 2009). Valószínűsíthető, hogy az OxAc további neuroaktív tulajdonságokkal is bír, melyek révén közreműködik a kinurenin kinurénsavvá alakításában (Hodgkins és mtsai., 1999). A kinurénsav egy nem kompetitív NMDA-receptor antagonist, mely az NMDA-receptorok aktivitásához szükséges koaktivátort, a glicint szorítja le kötőhelyéről, vagyis az OxAc-nak közvetett módon NMDA-receptor blokkoló hatása is lehet (Stone 1993).

Az OxAc későbbi terápiás alkalmazásának elsődleges feltétele az OxAc hatásmechanizmusának mind pontosabb ismerete. Ehhez a vegyület minél sokrétűbb vizsgálata szükséges. Ezidáig csak biokémiai vizsgálatokat végeztek az OxAc-tal kapcsolatban (Gottlieb és mtsai., 2003; Zlotnik és mtsai., 2007; Teichberg és mtsai., 2009). Kutatócsoportunk elsőként tanulmányozta az OxAc hatását ischaemiás modellen szövettani és elektrofiziológiai módszerekkel.

## 8. KÖVETKEZTETÉSEK

A célkitűzésekben megfogalmazott felvetésekre és kérdésekre vizsgálataink alapján az alábbi válaszokat adhatjuk:

### 8.1 *Trauma modell*

1) A kísérleteinkben alkalmazott Evans Blue festés alkalmasnak bizonyul a hideg lézió által kiváltott szöveti károsodás, valamint a penumra régió vizsgálatára. Ezzel a módszerrel- egyéb immunhisztokémiai eljárásokkal összehasonlítva- rövidebb idő alatt láthatóvá lehet tenni a lézió kiterjedését és a károsodott sejteket. Elsőként mutattunk ki EB-jelölődött piramissejteket a penumbra területéről. A módszer további előnye, hogy technikailag egyszerű, szenzitív, jól reprodukálható és költségtakarékos.

2) A DHEAS és az E<sub>2</sub> elő- és utókezelés formájában is hatékonynak bizonyult a hideg léziós modellben. Mindkét kezelési forma szignifikánsan csökkentette a szöveti lézió kiterjedését. A DHEAS neuroprotektív hatását a letrozole kezelés megszüntette, amiből arra következtethetünk, hogy a DHEAS protektív hatását az E<sub>2</sub> közvetíti.

### 8.2 *Stroke modell*

3) Elsőként vizsgáltuk szövettani módszerekkel az oxálecetsav hatását ischaemiás modellen. Kimutattuk, hogy az oxálecetsav neuroprotektív hatással rendelkezik, mely megnyilvánul a lézió kiterjedésének- és a degenerálódott neuronok számának csökkentésében.

## 9. ÖSSZEFOGLALÓ

A központi idegrendszeret érő különböző behatások (trauma, stroke) az agy szövetállományának pusztulását idézhetik elő. A károsodás mértéke az idő előre haladtával egyre fokozódik. A progresszió hátterében összetett kórélettani folyamatok állnak, melyek alapvetően meghatározzák az érintett egyén túlélési esélyeit. Az agyi inzultust követően elsőként az ún. elsődleges károsodás figyelhető meg, ami a szövetállomány közvetlen pusztulásában nyilvánul meg. Az elsődleges károsodás a nekrosis folyamatát foglalja magába és a károsodott terület centrális részére jellemző. Ez a terület a *core* vagy mag régió, melyre a teljes energetikai katasztrófa és a sejtek gyors pusztulása jellemző. A mag régió és az ép agyállomány között található határsáv az ún. penumbra régió. A penumbra legfőbb tulajdonsága, hogy az itt található sejtek döntően késleltetett sejthalállal, apoptózissal pusztulnak el. Nem megfelelő energetikai viszonyok között az idegsejtek először a funkciót áldozzák fel az integritásuk fenntartása érdekében. Ebben az esetben, megfelelő terápiák alkalmazásával a sejtek még megmenthetők. Ha az energetikai viszonyok tovább romlanak, a sejtek már nem képesek fenntartani a struktúrájukat sem és elpusztulnak. Mivel az apoptózis időben késleltetve jelentkezik, ez lehetőséget teremt olyan módszerek alkalmazására, melyekkel az apoptotikus sejtpusztulás megelőzhetővé válik. A penumbra ezen tulajdonságai alapján lett a neuroprotektív stratégiák legfőbb célpontja. Az apoptózis mellett további, időben késleltetve jelentkező, ún. másodlagos károsodások is megfigyelhetők a különböző neurológiai kórképekben. A másodlagos károsodások- pl. acidosis, O<sub>2</sub>-szabad gyökök felszabadulása, vér-agy gát permeabilitásának fokozódása, fokozott glutamát felszabadulás okozta excitotoxicitás- tovább rontják a sejtek túlélési esélyeit, ezáltal tovább növelik a károsodott terület kiterjedését. Ezen folyamatok megelőzésével, gátlásával csökkenthető a károsodás mértéke, melynek eredményeképpen a funkcionális, kiesési tünetek is mérséklődhetnek.

Kísérleteink egyik célja olyan módszerek adaptálása volt, melyekkel jól nyomon követhetővé válnak az agyi traumát, illetve stroke-ot követő pathofiziológiai folyamatok. Ebben a kísérletsorozatban az ún. hideg léziós modellt alkalmaztuk, melyben -78°C-ra lehűtött termódot érintettünk a kísérleti állatok agyához. A hideg következtében károsodott terület időbeli és térbeli változásait Evans Blue (EB)- és TTC-festéssel követtük. Az EB festés hasznos módszernek bizonyult, mert fluoreszcens tulajdonságait kihasználva könnyen megjeleníthető az agyi terület, melyet a vér-agy gát sérülése miatt az EB elárasztott. Az

érintett agyi területen (a penumbrában) a neuronok is felveszik az EB-t, így az EB-jelölődött piramissejtek is rövid idő alatt jól láthatóvá váltak. Mindez TTC festéssel ilyen részlet gazdagon nem megjeleníthető. Megállapítottuk, hogy az EB festés ezen tulajdonságai alapján alkalmas lehet potenciális neuroprotektív szerek szövettani hatásvizsgálatára. Ezt kísérletesen is igazoltuk olyan kísérletekben, melyben szteroidok hatását vizsgáltuk hideg léziós modellen. Arra kerestük a választ, hogy a dehidroepiandrosteron (DHEAS) és  $17\beta$ -ösztadiol ( $E_2$ ) kezelés képes-e csökkenteni a károsodott terület kiterjedését, illetve elő- vagy utókezelés formájában hatékony-e. Megállapítottuk, hogy a DHEAS és  $E_2$  elő- és utókezelés formájában is hatásos, a léziós területet szignifikánsan csökkenti. A DHEAS protektív tulajdonságát letrozole-lal gátolni tudtuk. A letrozole, egy aromatáz inhibitor- mely akadályozza a DHEAS aromás átalakulását  $E_2$ -vé. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a DHEAS sejtpusztulásra kifejtett pozitív hatását az  $E_2$  közvetíti.

Más neuroprotektív célú kutatásaink során a neuroprotekciónak egy teljesen új megközelítését teszteltük. Nevezetesen az oxálecetsav (OxAc) hatását vizsgáltuk meg egy stroke modellen. Fototrombotikus lézióval modelleztük a stroke-ot. Ennek lényege, hogy Rose Bengal keringésbe juttatásával és hideg fény alkalmazásával érelzáródást idéztünk elő patkányok agyában. Az érelzáródás következtében kialakuló energiakrízis egy többlépcsős kaszkádfolyamatot indít be, melyben központi szerepe van a glutamát (Glu) túlzott felszabadulásának. A fokozott Glu felszabadulás okozta excitotoxicitás nagy mértékben hozzájárul ahhoz, hogy az idegsejtek pusztulása szöveti szintre emelkedik. A szisztémásan adott OxAc neuroprotektív hatását közvetett módon fejt ki, mégpedig úgy, hogy a vérben levő Glu és a beinjektált OxAc a GOT enzim segítségével  $\alpha$ -ketoglutaráttá és aszpartáttá alakul. A folyamat következtében csökken a vér glutamát szintje és így megváltozik a vér és az agy interstitialis tere közti glutamát-koncentrációgrádiens. A kialakuló koncentráció viszonyok kedveznek a Glu agyból vérbe történő transzportjának. Ezzel a kezelési móddal tehát csökkenthető a Glu neuronokra gyakorolt excitotoxicitása. Az érelzáródás következtében károsodott kérgi területet Fluoro Jade B (FJB) festéssel vizualizáltuk. A FJB egy anionos fluorochrom, mely nagy szelektivitással jelöli a degenerálódott neuronokat, így alkalmazásával egyaránt vizsgálni lehet a léziós terület kiterjedését és a degenerálódott neuronok területegységre vonatkoztatott számát is. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az OxAc, mint lehetséges neuroprotektív hatású anyag, milyen módon befolyásolja a lézió méretét ill. a károsodott sejtek számát stroke modellünkben. Kimutattuk, hogy az OxAc

neuroprotektív hatással rendelkezik, mely szignifikánsan csökkenti a lézió kiterjedését és a degenerálódott neuronok számát. Fontos észlelésünk volt az is, hogy a léziót követően az OxAc-kezelést kapott állatok jóval nagyobb arányban éltek túl.

A glutamát scavenger OxAc-kezelés újszerű megközelítést jelent a jelenleg kutatott és alkalmazott neuroprotektív stratégiák között. Későbbi terápiás alkalmazása további elektrofiziológiai, szövettani, biokémiai és toxikológiai vizsgálatokat kíván.

## 10. SUMMARY

Ischaemic and traumatic brain injuries may be due to a variety of causes that impair the cerebral blood flow and lead to the deprivation of both oxygen and glucose. When persistent and critical, they may result in neuronal death. The cells at the centre of the ischaemic focus, the ischaemic core, are especially vulnerable and may die within minutes of the ischaemic onset, usually in necrotic processes. The ischaemic penumbra surrounding the core is an area of reduced perfusion in which the cells are still viable. The cells in the ischaemic penumbra or adjacent to the core of the trauma are subject to various pathological processes that can lead to their own death and that of their neighbours. These death-promoting mechanisms are shared by both ischaemic and traumatic brain injuries. These mechanisms include excitotoxicity, the overproduction of free radicals, a blood-brain barrier disruption, inflammation, apoptosis, etc.

The main characteristic of the penumbra is that its cells mainly die by apoptosis, which is a process of delayed neuronal death. Because of these characteristics, it has become the main target of neuroprotective interventions.

One of the aims of our work was to adapt an animal model that helps in the tracking of pathophysiological procedures after brain trauma or stroke. In this series of experiments, we used a cold injury model. A copper cylinder cooled to  $-78^{\circ}\text{C}$  was applied to the skull of the animals. As a quick test, Evans Blue (EB) and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) were used to follow the changes in the damaged area in time and space. We used EB to visualize the area where the blood-brain barrier was disrupted. In this area of the penumbra, EB entered the cells, and the EB-positive cells therefore became visible within a short time. We found that thanks to the above characteristics of EB staining, it could be used to test the presumed neuroprotective effects of candidate agents. In a series of experiments, we examined the effects of steroids on the cold injury model. Our aim was to test whether treatment with dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) and  $17\beta$ -oestradiol ( $\text{E}_2$ ) can decrease the extent of the damaged tissue, and whether they are effective in pre- or post-treatments. Both DHEAS and  $\text{E}_2$  proved effective in decreasing the extent of the lesion in both pre- and post-treatments. The protective effect of DHEAS could be blocked by letrozole, an aromatase inhibitor that prevents the aromatic transformation of DHEAS into  $\text{E}_2$ . We presume that the positive effect of DHEAS on cell destruction is in fact achieved by  $\text{E}_2$ .



A new neuropotective approach was tested in experiments in which the glutamate (Glu) scavenger oxaloacetate (OxAc) was administered.

A traumatic brain injury or a focal brain lesion is followed by acute excitotoxicity caused by the presence of abnormally high Glu levels in the cerebrospinal and interstitial fluids, which is generally observed at the histological level by the presence of a cortical infarction. The intravenous administration of OxAc activates the blood-resident glutamate–oxaloacetate transaminase and leads to blood Glu scavenging by the transamination of Glu into 2-ketoglutarate as a result of an accelerated efflux of the excess brain Glu into the blood, and neuroprotection is achieved.

In this study, we subjected rats to a photothrombotic lesion and treated them after the illumination with a single 30-minute long administration of OxAc. Following induction of the lesion, we visualized the dead cells and measured the infarct size, using Fluro Jade B (FJB) staining histology. FJB is an anionic fluorochrome capable of selectively staining degenerating neurones and thus the region of the lesion and the number of degenerated neurones can be established.

The results we obtained clearly fulfilled the expectation that OxAc has a neuroprotective effect resulting in a reduction in the volume of the lesion and in a decreased number of degenerated neurones. Another important difference after the lesion was that the animals treated with OxAc survived in greater number.

Treatment with the Glu scavenger OxAc- is a new approach among the neuroprotective strategies used today. The possible therapeutic application of OxAc necessitates additional electrophysiological, histological, biochemical and toxicological experiments.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Toldi József professzor úrnak türelméért és mindazokért a hasznos tanácsokért, észrevételekért amivel munkámat irányította, segítette; embersége példamutató számomra.

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Kis Zsoltnak, hogy tudásával, gyakorlatias gondolkodásával sokszor segített át a nehézségeken, köszönöm a könnycsordító humorát és azt, hogy nem csak a közös munka során számíthattam rá és családjára.

Köszönettel tartozok Enikő Racekovának és Jozef Burdának a baráti fogadtatásért Kassán és az önzetlenségükért amivel tudásukat átadták.

Köszönöm Gellért Leventének, Nagy Dávidnak, Marosi Máténak és Lür Györgynek, hogy segítették a gyakorlati munkámat. Köszönettel tartozok Dr.Varga Csabának örök optimizmusáért, végtelen jóindulatáért, Veketyné Váradi Margónak a rengeteg adminisztrációs segítségért.

Szeretném megköszönni Görögné Dr. Németh Hajnalkának a barátságát, támogatását és hogy élő lelkiismeretem volt az elmúlt időszakban. Köszönöm Rékának, Szandinak és Zolinak, Dórinak és Szilvinek, hogy madarat tolláról...

Végtelenül hálás vagyok testvéremnek a “nagy és értékes” segítségéért, amivel láthatatlanná tette számítástechnikai hiányosságaimat.

Eddig még nem volt rá módom, így ezúton szeretném megköszönni szüleimnek a támogatásukat, az értem hozott áldozataikat és a bizalmukat, hogy számukra sosem volt kétséges, hogy eljuthatok idáig.

## 12. IRODALOMJEGYZÉK

Ahmed N., Nasman P. and Wahlgren N. G. (2000). "Effect of intravenous nimodipine on blood pressure and outcome after acute stroke." Stroke **31**(6): 1250-5.

Astrup J., Siesjo B. K. and Symon L. (1981). "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra." Stroke **12**(6): 723-5.

Atlante A., Calissano P., Bobba A., Giannattasio S., Marra E. and Passarella S. (2001). "Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria." FEBS Lett **497**(1): 1-5.

Baulieu E. E. (1991). "Neurosteroids: a new function in the brain." Biol Cell **71**(1-2): 3-10.

Baulieu E. E. and Robel P. (1996). "Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate as neuroactive neurosteroids." J Endocrinol **150 Suppl**: S221-39.

Baulieu E. E. and Robel P. (1998). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4089-91.

Belelli D., Lan N. C. and Gee K. W. (1990). "Anticonvulsant steroids and the GABA/benzodiazepine receptor-chloride ionophore complex." Neurosci Biobehav Rev **14**(3): 315-22.

Benveniste H. (1991). "The excitotoxin hypothesis in relation to cerebral ischemia." Cerebrovasc Brain Metab Rev **3**(3): 213-45.

Beral V. (2003). "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study." Lancet **362**(9382): 419-27.

Biagini G., Panuccio G. and Avoli M. (2010). "Neurosteroids and epilepsy." Curr Opin Neurol **23**(2): 170-6.

Biegon A., Fry P. A., Paden C. M., Alexandrovich A., Tsenter J. and Shohami E. (2004). "Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 5117-22.

Bordi F., Pietra C., Ziviani L. and Reggiani A. (1997). "The glycine antagonist GV150526 protects somatosensory evoked potentials and reduces the infarct area in the MCAo model of focal ischemia in the rat." Exp Neurol **145**(2 Pt 1): 425-33.

Bullock R., Zauner A., Woodward J. J., Myseros J., Choi S. C., Ward J. D., Marmarou A. and Young H. F. (1998). "Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury." J Neurosurg **89**(4): 507-18.

Castillo J., Davalos A. and Noya M. (1997). "Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids." Lancet **349**(9045): 79-83.

Chan P. H. (1992). "Antioxidant-dependent amelioration of brain injury: role of CuZn-superoxide dismutase." J Neurotrauma **9 Suppl 2**: S417-23.

Chan P. H., Fishman R. A., Caronna J., Schmidley J. W., Prioleau G. and Lee J. (1983). "Induction of brain edema following intracerebral injection of arachidonic acid." Ann Neurol **13**(6): 625-32.

Chan P. H., Longar S. and Fishman R. A. (1987). "Protective effects of liposome-entrapped superoxide dismutase on posttraumatic brain edema." Ann Neurol **21**(6): 540-7.

Chan P. H., Yang G. Y., Chen S. F., Carlson E. and Epstein C. J. (1991). "Cold-induced brain edema and infarction are reduced in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase." Ann Neurol **29**(5): 482-6.

Charriaut-Marlangue C., Margaill I., Represa A., Popovici T., Plotkine M. and Ben-Ari Y. (1996). "Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis." J Cereb Blood Flow Metab **16**(2): 186-94.

Cheng Y. D., Al-Khoury L. and Zivin J. A. (2004). "Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure." NeuroRx **1**(1): 36-45.

Choi D. W. (1988). "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system." Neuron **1**(8): 623-34.

Choi D. W. (1994). "Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death." Prog Brain Res **100**: 47-51.

Choi D. W. and Rothman S. M. (1990). "The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death." Annu Rev Neurosci **13**: 171-82.

Clark W. M., Wissman S., Albers G. W., Jhamandas J. H., Madden K. P. and Hamilton S. (1999). "Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke." JAMA **282**(21): 2019-26.

Collard C. D. and Gelman S. (2001). "Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury." Anesthesiology **94**(6): 1133-8.

Compagnone N. A. (2008). "Treatments for spinal cord injury: is there hope in neurosteroids?" J Steroid Biochem Mol Biol **109**(3-5): 307-13.

Compagnone N. A. and Mellon S. H. (1998). "Dehydroepiandrosterone: a potential signalling molecule for neocortical organization during development." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4678-83.

Cordey M. and Pike C. J. (2005). "Neuroprotective properties of selective estrogen receptor agonists in cultured neurons." Brain Res **1045**(1-2): 217-23.

Coyle P. (1987). "Spatial relations of dorsal anastomoses and lesion border after middle cerebral artery occlusion." Stroke **18**(6): 1133-40.

Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P. and Salvemini D. (2001). "Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury." Pharmacol Rev **53**(1): 135-59.

D'Astous M., Morissette M., Tanguay B., Callier S. and Di Paolo T. (2003). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) such as 17beta-estradiol prevents MPTP-induced dopamine depletion in mice." Synapse **47**(1): 10-4.

Danbolt N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol **65**(1): 1-105.

Debonnel G., Bergeron R. and de Montigny C. (1996). "Potentiation by dehydroepiandrosterone of the neuronal response to N-methyl-D-aspartate in the CA3 region of the rat dorsal hippocampus: an effect mediated via sigma receptors." J Endocrinol **150 Suppl**: S33-42.

Domorakova I., Burda J., Mechirova E. and Ferikova M. (2006). "Mapping of rat hippocampal neurons with NeuN after ischemia/reperfusion and Ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment." Cell Mol Neurobiol **26**(7-8): 1193-204.

Du C., Hu R., Csernansky C. A., Hsu C. Y. and Choi D. W. (1996). "Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis?" J Cereb Blood Flow Metab **16**(2): 195-201.

Dubal D. B., Shughrue P. J., Wilson M. E., Merchenthaler I. and Wise P. M. (1999). "Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors." J Neurosci **19**(15): 6385-93.

Dubal D. B., Zhu H., Yu J., Rau S. W., Shughrue P. J., Merchenthaler I., Kindy M. S. and Wise P. M. (2001). "Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1952-7.

Dubinsky J. M., Brustovetsky N., Pinelis V., Kristal B. S., Herman C. and Li X. (1999). "The mitochondrial permeability transition: the brain's point of view." Biochem Soc Symp **66**: 75-84.

Dyker A. G. and Lees K. R. (1998). "Duration of neuroprotective treatment for ischemic stroke." Stroke **29**(2): 535-42.

el-Rahman A., Hammouda M. A. and Fakeir A. (1995). "Flow cytometric evaluation of erythrocyte response to oxidant stress." Cytometry **20**(1): 19-22.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A. and Nagata S. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.

Eriskat J., Schurer L., Kempinski O. and Baethmann A. (1994). "Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion." Acta Neurochir Suppl (Wien) **60**: 425-7.

Farooqui A. A., Yang H. C. and Horrocks L. (1997). "Involvement of phospholipase A2 in neurodegeneration." Neurochem Int **30**(6): 517-22.

Fishman R. A. (1975). "Brain edema." N Engl J Med **293**(14): 706-11.

Fontaine-Lenoir V., Chambrud B., Fellous A., David S., Duchossoy Y., Baulieu E. E. and Robel P. (2006). "Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4711-6.

Foresti R. and Motterlini R. (1999). "The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis." Free Radic Res **31**(6): 459-75.

Garcia-Segura L. M., Azcoitia I. and DonCarlos L. L. (2001). "Neuroprotection by estradiol." Prog Neurobiol **63**(1): 29-60.

Garcia-Segura L. M., Cardona-Gomez P., Naftolin F. and Chowen J. A. (1998). "Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons." Neuroreport **9**(4): 593-7.

Garcia J. H. and Anderson M. L. (1989). "Physiopathology of cerebral ischemia." Crit Rev Neurobiol **4**(4): 303-24.

Gladstone D. J., Black S. E. and Hakim A. M. (2002). "Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions." Stroke **33**(8): 2123-36.

Goll D. E., Thompson V. F., Li H., Wei W. and Cong J. (2003). "The calpain system." Physiol Rev **83**(3): 731-801.

Golstein P. and Kroemer G. (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.

Gopinath S. P., Valadka A. B., Goodman J. C. and Robertson C. S. (2000). "Extracellular glutamate and aspartate in head injured patients." Acta Neurochir Suppl **76**: 437-8.

Gorlach C., Hortobagyi T., Benyo Z. and Wahl M. (2000). "Aminoguanidine reduces brain lesion volume after cold injury in the rat." Pflugers Arch **440**(2): 309-14.

Gorlach C., Hortobagyi T., Hortobagyi S., Benyo Z., Relton J., Whalley E. T. and Wahl M. (2001). "Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury." J Neurotrauma **18**(8): 833-8.



Gottlieb M., Wang Y. and Teichberg V. I. (2003). "Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate." J Neurochem **87**(1): 119-26.

Grabowski M., Johansson B. B. and Brundin P. (1994). "Survival of fetal neocortical grafts implanted in brain infarcts of adult rats: the influence of postlesion time and age of donor tissue." Exp Neurol **127**(1): 126-36.

Hajszan T., MacLusky N. J. and Leranth C. (2004). "Dehydroepiandrosterone increases hippocampal spine synapse density in ovariectomized female rats." Endocrinology **145**(3): 1042-5.

Hass W. K. (1983). "The cerebral ischemic cascade." Neurol Clin **1**(1): 345-53.

Hata R., Maeda K., Hermann D., Mies G. and Hossmann K. A. (2000). "Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice." J Cereb Blood Flow Metab **20**(2): 306-15.

Hayes R. L., Yang K., Raghupathi R. and McIntosh T. K. (1995). "Changes in gene expression following traumatic brain injury in the rat." J Neurotrauma **12**(5): 779-90.

Hediger M. A. and Welbourne T. C. (1999). "Introduction: glutamate transport, metabolism, and physiological responses." Am J Physiol **277**(4 Pt 2): F477-80.

Hermann D. M., Hossmann K. A. and Mies G. (2004). "Expression of c-jun, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, caspase-3 and glial fibrillary acidic protein following cortical cold injury in rats: relationship to metabolic disturbances and delayed cell death." Neuroscience **123**(2): 371-9.

Hertz L. (2008). "Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective." Neuropharmacology **55**(3): 289-309.

Hodgkins P. S., Wu H. Q., Zielke H. R. and Schwarcz R. (1999). "2-Oxoacids regulate kynurenic acid production in the rat brain: studies in vitro and in vivo." J Neurochem **72**(2): 643-51.

Hortobagyi T., Hortobagyi S., Gorlach C., Harkany T., Benyo Z., Gorogh T., Nagel W. and Wahl M. (2000). "A novel brain trauma model in the mouse: effects of dexamethasone treatment." Pflugers Arch **441**(2-3): 409-15.

Hossmann K. A. (1982). "Treatment of experimental cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **2**(3): 275-97.

Hovda D. A., Becker D. P. and Katayama Y. (1992). "Secondary injury and acidosis." J Neurotrauma **9 Suppl 1**: S47-60.

Ikeda Y., Wang M. and Nakazawa S. (1994). "Simple quantitative evaluation of blood-brain barrier disruption in vasogenic brain edema." Acta Neurochir Suppl (Wien) **60**: 119-20.

Imaizumi S., Woolworth V., Fishman R. A. and Chan P. H. (1990). "Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces cerebral infarction in cerebral ischemia in rats." Stroke **21**(9): 1312-7.

Jatzke C., Watanabe J. and Wollmuth L. P. (2002). "Voltage and concentration dependence of Ca(2+) permeability in recombinant glutamate receptor subtypes." J Physiol **538**(Pt 1): 25-39.

Jennett W. B. (1970). "Secondary ischaemic brain damage after head injury." J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol) **4**: 172-5.

Johansson B. B. and Grabowski M. (1994). "Functional recovery after brain infarction: plasticity and neural transplantation." Brain Pathol **4**(1): 85-95.

Juhasz-Vedres G., Rozsa E., Rakos G., Dobszay M. B., Kis Z., Wolfling J., Toldi J., Parducz A. and Farkas T. (2006). "Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective when

administered either before or after injury in a focal cortical cold lesion model." Endocrinology **147**(2): 683-6.

Kahle K. T., Simard J. M., Staley K. J., Nahed B. V., Jones P. S. and Sun D. (2009). "Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport." Physiology (Bethesda) **24**: 257-65.

Katzan I. L., Furlan A. J., Lloyd L. E., Frank J. I., Harper D. L., Hinchey J. A., Hammel J. P., Qu A. and Sila C. A. (2000). "Use of tissue-type plasminogen activator for acute ischemic stroke: the Cleveland area experience." JAMA **283**(9): 1151-8.

Kawahara A., Enari M., Talanian R. V., Wong W. W. and Nagata S. (1998). "Fas-induced DNA fragmentation and proteolysis of nuclear proteins." Genes Cells **3**(5): 297-306.

Kharlamov A., Uz T., Joo J. Y. and Manev H. (1996). "Pharmacological characterization of apoptotic cell death in a model of photothrombotic brain injury in rats." Brain Res **734**(1-2): 1-9.

Kimonides V. G., Khatibi N. H., Svendsen C. N., Sofroniew M. V. and Herbert J. (1998). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1852-7.

Kinouchi H., Epstein C. J., Mizui T., Carlson E., Chen S. F. and Chan P. H. (1991). "Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11158-62.

Klatzo I. (1987). "Pathophysiological aspects of brain edema." Acta Neuropathol **72**(3): 236-9.

Klatzo I., Piraux A. and Laskowski E. J. (1958). "The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury." J Neuropathol Exp Neurol **17**(4): 548-64.

Kokate T. G., Svensson B. E. and Rogawski M. A. (1994). "Anticonvulsant activity of neurosteroids: correlation with gamma-aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation." J Pharmacol Exp Ther **270**(3): 1223-9.

Lambert J. J., Belelli D., Hill-Venning C. and Peters J. A. (1995). "Neurosteroids and GABAA receptor function." Trends Pharmacol Sci **16**(9): 295-303.

Lapchak P. A., Chapman D. F., Nunez S. Y. and Zivin J. A. (2000). "Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors." Stroke **31**(8): 1953-6; discussion 1957.

Lassen N. A. (1990). "Pathophysiology of brain ischemia as it relates to the therapy of acute ischemic stroke." Clin Neuropharmacol **13 Suppl 3**: S1-8.

Lee J. M., Zipfel G. J. and Choi D. W. (1999). "The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms." Nature **399**(6738 Suppl): A7-14.

Leist M. and Nicotera P. (1998). "Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology." Exp Cell Res **239**(2): 183-201.

Leskiewicz M., Budziszewska B., Basta-Kaim A., Zajac A., Kacinski M. and Lason W. (2006). "Effects of neurosteroids on neuronal survival: molecular basis and clinical perspectives." Acta Neurobiol Exp (Wars) **66**(4): 359-67.

Liang D., Bhatta S., Gerzanich V. and Simard J. M. (2007). "Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling." Neurosurg Focus **22**(5): E2.

Lockhart E. M., Warner D. S., Pearlstein R. D., Penning D. H., Mehrabani S. and Boustany R. M. (2002). "Allopregnanolone attenuates N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in culture." Neurosci Lett **328**(1): 33-6.

Losem-Heinrichs E., Gorg B., Schleicher A., Redecker C., Witte O. W., Zilles K. and Bidmon H. J. (2004). "A combined treatment with 1alpha,25-dihydroxy-vitamin D3 and 17beta-estradiol reduces the expression of heat shock protein-32 (HSP-32) following cerebral cortical ischemia." J Steroid Biochem Mol Biol **89-90**(1-5): 371-4.

MacLusky N. J., Hajszan T. and Leranth C. (2004). "Effects of dehydroepiandrosterone and flutamide on hippocampal CA1 spine synapse density in male and female rats: implications for the role of androgens in maintenance of hippocampal structure." Endocrinology **145**(9): 4154-61.

Majewska M. D. (1992). "Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance." Prog Neurobiol **38**(4): 379-95.

Majewska M. D., Harrison N. L., Schwartz R. D., Barker J. L. and Paul S. M. (1986). "Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor." Science **232**(4753): 1004-7.

Mao X. and Barger S. W. (1998). "Neuroprotection by dehydroepiandrosterone-sulfate: role of an NFkappaB-like factor." Neuroreport **9**(4): 759-63.

Marosi M., Fuzik J., Nagy D., Rakos G., Kis Z., Vecsei L., Toldi J., Ruban-Matuzani A., Teichberg V. I. and Farkas T. (2009). "Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion." Eur J Pharmacol **604**(1-3): 51-7.

Marosi M., Rakos G., Robotka H., Nemeth H., Sas K., Kis Z., Farkas T., Lur G., Vecsei L. and Toldi J. (2006). "Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia." J Neurosci Methods **156**(1-2): 231-5.

Martin L. J., Al-Abdulla N. A., Brambrink A. M., Kirsch J. R., Sieber F. E. and Portera-Cailliau C. (1998). "Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis." Brain Res Bull **46**(4): 281-309.

Maurice T. (2002). "Improving Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits with sigma1 Receptor Agonists." Drug News Perspect **15**(10): 617-625.

Maurice T., Phan V. L., Urani A., Kamei H., Noda Y. and Nabeshima T. (1999). "Neuroactive neurosteroids as endogenous effectors for the sigma1 (sigma1) receptor: pharmacological evidence and therapeutic opportunities." Jpn J Pharmacol **81**(2): 125-55.

Mayo W., Le Moal M. and Abrous D. N. (2001). "Pregnenolone sulfate and aging of cognitive functions: behavioral, neurochemical, and morphological investigations." Horm Behav **40**(2): 215-7.

Meldrum B. and Garthwaite J. (1990). "Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease." Trends Pharmacol Sci **11**(9): 379-87.

Mellon S. H. and Griffin L. D. (2002). "Neurosteroids: biochemistry and clinical significance." Trends Endocrinol Metab **13**(1): 35-43.

Milman A., Zohar O., Maayan R., Weizman R. and Pick C. G. (2008). "DHEAS repeated treatment improves cognitive and behavioral deficits after mild traumatic brain injury." Eur Neuropsychopharmacol **18**(3): 181-7.

Mongan P. D., Fontana J. L., Chen R. and Bunger R. (1999). "Intravenous pyruvate prolongs survival during hemorrhagic shock in swine." Am J Physiol **277**(6 Pt 2): H2253-63.

Moro M. A., Cardenas A., Hurtado O., Leza J. C. and Lizasoain I. (2004). "Role of nitric oxide after brain ischaemia." Cell Calcium **36**(3-4): 265-75.

Mullen R. J., Buck C. R. and Smith A. M. (1992). "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates." Development **116**(1): 201-11.

Murakami K., Kondo T., Sato S., Li Y. and Chan P. H. (1997). "Occurrence of apoptosis following cold injury-induced brain edema in mice." Neuroscience **81**(1): 231-7.

Murakami K., Kondo T., Yang G., Chen S. F., Morita-Fujimura Y. and Chan P. H. (1999). "Cold injury in mice: a model to study mechanisms of brain edema and neuronal apoptosis." Prog Neurobiol **57**(3): 289-99.

Murphy C. L. and Lever M. J. (2002). "A ratiometric method of autofluorescence correction used for the quantification of Evans blue dye fluorescence in rabbit arterial tissues." Exp Physiol **87**(2): 163-70.

Murray C. J. and Lopez A. D. (1997). "Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study." Lancet **349**(9064): 1498-504.

Nag S., Manias J. L. and Stewart D. J. (2009). "Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema." Acta Neuropathol **118**(2): 197-217.

Nag S., Picard P. and Stewart D. J. (2000). "Increased immunolocalization of nitric oxide synthases during blood-brain barrier breakdown and cerebral edema." Acta Neurochir Suppl **76**: 65-8.

Nagababu E. and Rifkind J. M. (1998). "Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide." Biochem Biophys Res Commun **247**(3): 592-6.

Nagababu E. and Rifkind J. M. (2004). "Heme degradation by reactive oxygen species." Antioxid Redox Signal **6**(6): 967-78.

Nagy D., Marosi M., Kis Z., Farkas T., Rakos G., Vecsei L., Teichberg V. I. and Toldi J. (2009). "Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex." Cell Mol Neurobiol **29**(6-7): 827-35.

Nedergaard M. (1988). "Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia." Acta Neurol Scand **77**(2): 81-101.

Nicotera P., Leist M., Fava E., Berliocchi L. and Volbracht C. (2000). "Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death." Brain Pathol **10**(2): 276-82.

O'Kane R. L., Martinez-Lopez I., DeJoseph M. R., Vina J. R. and Hawkins R. A. (1999). "Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal." J Biol Chem **274**(45): 31891-5.

Obrenovitch T. P. (1998). "Neuroprotective strategies: voltage-gated Na<sup>+</sup>-channel down-modulation versus presynaptic glutamate release inhibition." Rev Neurosci **9**(3): 203-11.

Paul S. M. and Purdy R. H. (1992). "Neuroactive steroids." FASEB J **6**(6): 2311-22.

Pavlik A., Aneja I. S., Lexa J. and Al-Zoabi B. A. (2003). "Identification of cerebral neurons and glial cell types inducing heat shock protein Hsp70 following heat stress in the rat." Brain Res **973**(2): 179-89.

Plassart-Schiess E. and Baulieu E. E. (2001). "Neurosteroids: recent findings." Brain Res Brain Res Rev **37**(1-3): 133-40.

Plesnila N., Friedrich D., Eriskat J., Baethmann A. and Stoffel M. (2003). "Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats." Neurosci Lett **345**(2): 85-8.

Pooler J. P. and Valenzano D. P. (1981). "Dye-sensitized photodynamic inactivation of cells." Med Phys **8**(5): 614-28.



Pozsegovits K., Kazuo S. and Nagy Z. (2006). "[Epidemiology of stroke in the elderly]." Ideggyogy Sz **59**(11-12): 449-53.

Pulsinelli W. A., Brierley J. B. and Plum F. (1982). "Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia." Ann Neurol **11**(5): 491-8.

Racchi M., Govoni S., Solerte S. B., Galli C. L. and Corsini E. (2001). "Dehydroepiandrosterone and the relationship with aging and memory: a possible link with protein kinase C functional machinery." Brain Res Brain Res Rev **37**(1-3): 287-93.

Rao M. L. and Kolsch H. (2003). "Effects of estrogen on brain development and neuroprotection--implications for negative symptoms in schizophrenia." Psychoneuroendocrinology **28 Suppl 2**: 83-96.

Rink A., Fung K. M., Trojanowski J. Q., Lee V. M., Neugebauer E. and McIntosh T. K. (1995). "Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat." Am J Pathol **147**(6): 1575-83.

Roberts E., Bologna L., Flood J. F. and Smith G. E. (1987). "Effects of dehydroepiandrosterone and its sulfate on brain tissue in culture and on memory in mice." Brain Res **406**(1-2): 357-62.

Rupprecht R. and Holsboer F. (1999). "Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives." Trends Neurosci **22**(9): 410-6.

Saito A., Tominaga T. and Chan P. H. (2005). "Neuroprotective role of neurotrophins: relationship between nerve growth factor and apoptotic cell survival pathway after cerebral ischemia." Curr Atheroscler Rep **7**(4): 268-73.

Sasaki S. and Schneider H. (1976). "Supravital diffusion of fluorescent Evans blue in brain and spinal cord tissue." Acta Neuropathol **36**(4): 363-8.

Sayeed I., Guo Q., Hoffman S. W. and Stein D. G. (2006). "Allopregnanolone, a progesterone metabolite, is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion." Ann Emerg Med **47**(4): 381-9.

Schmidt-Kastner R. and Olson L. (1995). "Decrease of neurotrophin-3 mRNA in adult rat hippocampus after pilocarpine seizures." Exp Neurol **136**(2): 199-204.

Schmued L. C., Albertson C. and Slikker W., Jr. (1997). "Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration." Brain Res **751**(1): 37-46.

Schmued L. C. and Hopkins K. J. (2000). "Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration." Toxicol Pathol **28**(1): 91-9.

Segal M. B., Preston J. E., Collis C. S. and Zlokovic B. V. (1990). "Kinetics and Na independence of amino acid uptake by blood side of perfused sheep choroid plexus." Am J Physiol **258**(5 Pt 2): F1288-94.

Shaw P. J., Forrest V., Ince P. G., Richardson J. P. and Wastell H. J. (1995). "CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients." Neurodegeneration **4**(2): 209-16.

Sims N. R. and Anderson M. F. (2002). "Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke." Neurochem Int **40**(6): 511-26.

Singer C. A., Rogers K. L. and Dorsa D. M. (1998). "Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons." Neuroreport **9**(11): 2565-8.

Small D. L. and Buchan A. M. (2000). "Animal models." Br Med Bull **56**(2): 307-17.

Spreux-Varoquaux O., Bensimon G., Lacomblez L., Salachas F., Pradat P. F., Le Forestier N., Marouan A., Dib M. and Meininger V. (2002). "Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients." J Neurol Sci **193**(2): 73-8.

Stieg P. E., Sathi S., Warach S., Le D. A. and Lipton S. A. (1999). "Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat." Eur J Pharmacol **375**(1-3): 115-20.

Stoffel M., Rinecker M., Plesnila N., Eriskat J. and Baethmann A. (2001). "Role of nitric oxide in the secondary expansion of a cortical brain lesion from cold injury." J Neurotrauma **18**(4): 425-34.

Stone T. W. (1993). "Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids." Pharmacol Rev **45**(3): 309-79.

Stover J. F. and Unterberg A. W. (2000). "Increased cerebrospinal fluid glutamate and taurine concentrations are associated with traumatic brain edema formation in rats." Brain Res **875**(1-2): 51-5.

Sugawara T. and Chan P. H. (2003). "Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia." Antioxid Redox Signal **5**(5): 597-607.

Symon L., Branston N. M., Strong A. J. and Hope T. D. (1977). "The concepts of thresholds of ischaemia in relation to brain structure and function." J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol) **11**: 149-54.

Tang G., White J. E., Gordon R. J., Lumb P. D. and Tsan M. F. (1993). "Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase protects rats against oxygen toxicity." J Appl Physiol **74**(3): 1425-31.

Teichberg V. I., Cohen-Kashi-Malina K., Cooper I. and Zlotnik A. (2009). "Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies." Neuroscience **158**(1): 301-8.

Touzani O., Roussel S. and MacKenzie E. T. (2001). "The ischaemic penumbra." Curr Opin Neurol **14**(1): 83-8.

Toyokuni S. (1999). "Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology." Pathol Int **49**(2): 91-102.

Ueda H. and Fujita R. (2004). "Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain." Biol Pharm Bull **27**(7): 950-5.

Umemura K., Shimakura A. and Nakashima M. (1997). "Neuroprotective effect of a novel AMPA receptor antagonist, YM90K, in rat focal cerebral ischaemia." Brain Res **773**(1-2): 61-5.

van Landeghem F. K., Weiss T., Oehmichen M. and von Deimling A. (2006). "Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury." J Neurotrauma **23**(10): 1518-28.

Veiga S., Garcia-Segura L. M. and Azcoitia I. (2003). "Neuroprotection by the steroids pregnenolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase." J Neurobiol **56**(4): 398-406.

Vesce S., Rossi D., Brambilla L. and Volterra A. (2007). "Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation." Int Rev Neurobiol **82**: 57-71.

Vokó Z. (2008). "Az agyérbetegségek epidemiológiája Magyarországon az ezredfordulót követően." LAM **18**: 31-38.

Wang H. G., Pathan N., Ethell I. M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Franke T. F. and Reed J. C. (1999). "Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD." Science **284**(5412): 339-43.

Watson B. D., Dietrich W. D., Busto R., Wachtel M. S. and Ginsberg M. D. (1985). "Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis." Ann Neurol **17**(5): 497-504.

Werner C. and Engelhard K. (2007). "Pathophysiology of traumatic brain injury." Br J Anaesth **99**(1): 4-9.

White B. C., Sullivan J. M., DeGracia D. J., O'Neil B. J., Neumar R. W., Grossman L. I., Rafols J. A. and Krause G. S. (2000). "Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury." J Neurol Sci **179**(S 1-2): 1-33.

Wise P. M., Dubal D. B., Wilson M. E. and Rau S. W. (2000). "Estradiol is a neuroprotective factor in in vivo and in vitro models of brain injury." J Neurocytol **29**(5-6): 401-10.

Wise P. M., Dubal D. B., Wilson M. E., Rau S. W., Bottner M. and Rosewell K. L. (2001). "Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies." Brain Res Brain Res Rev **37**(1-3): 313-9.

Wolman M., Klatzo I., Chui E., Wilmes F., Nishimoto K., Fujiwara K. and Spatz M. (1981). "Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier." Acta Neuropathol **54**(1): 55-61.

Wright A., Hawkins C. L. and Davies M. J. (2003). "Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides." Free Radic Biol Med **34**(6): 637-47.

Wu F. S., Gibbs T. T. and Farb D. H. (1991). "Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor." Mol Pharmacol **40**(3): 333-6.

Xilouri M. and Papazafiri P. (2006). "Anti-apoptotic effects of allopregnanolone on P19 neurons." Eur J Neurosci **23**(1): 43-54.

Yamamoto T., Rossi S., Stiefel M., Doppenberg E., Zauner A., Bullock R. and Marmarou A. (1999). "CSF and ECF glutamate concentrations in head injured patients." Acta Neurochir Suppl **75**: 17-9.

Yang S. H., Liu R., Wu S. S. and Simpkins J. W. (2003). "The use of estrogens and related compounds in the treatment of damage from cerebral ischemia." Ann N Y Acad Sci **1007**: 101-7.

Yang S. H., Shi J., Day A. L. and Simpkins J. W. (2000). "Estradiol exerts neuroprotective effects when administered after ischemic insult." Stroke **31**(3): 745-9; discussion 749-50.

Zauner A., Bullock R., Kuta A. J., Woodward J. and Young H. F. (1996). "Glutamate release and cerebral blood flow after severe human head injury." Acta Neurochir Suppl **67**: 40-4.

Zhang X., Qiu M., Zhang J., Zhang H. and Kang D. (1998). "Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid and their relations with clinical features and outcomes in acute head injury." Chin Med J (Engl) **111**(11): 978-81.

Zlotnik A., Gruenbaum S. E., Artru A. A., Rozet I., Dubilet M., Tkachov S., Brotfain E., Klin Y., Shapira Y. and Teichberg V. I. (2009). "The neuroprotective effects of oxaloacetate in closed head injury in rats is mediated by its blood glutamate scavenging activity: evidence from the use of maleate." J Neurosurg Anesthesiol **21**(3): 235-41.

Zlotnik A., Gurevich B., Cherniavsky E., Tkachov S., Matuzani-Ruban A., Leon A., Shapira Y. and Teichberg V. I. (2008). "The contribution of the blood glutamate scavenging activity of pyruvate to its neuroprotective properties in a rat model of closed head injury." Neurochem Res **33**(6): 1044-50.

Zlotnik A., Gurevich B., Tkachov S., Maoz I., Shapira Y. and Teichberg V. I. (2007). "Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate." Exp Neurol **203**(1): 213-20.

Zwain I. H. and Yen S. S. (1999). "Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain." Endocrinology **140**(2): 880-7.

Harcos Péter dr. (1999). Stroke prevenciók stratégiák. Háziorvos Továbbképző Szemle **4**:84-86.

Magyar Idegsebészeti Társaság programtervezete 2003. Idegsebészeti Klinika- MIT szekció  
<http://neurosurgery.pote.hu/mit/php/main.php?menu=0005>

### 13. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Nagy D, Marosi M, Kis Z, Farkas T, **Rákos G**, Vécsei L, Teichberg VI, Toldi J

*Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischaemia in the rat cortex*

**Cellular and molecular neurobiology 2009 Sep;29(6-7):827-35**

(Impakt faktor:2.107)

Marosi M, Fuzik J, Nagy D, **Rákos G**, Kis Z, Vécsei L, Toldi J, Ruban-Matuzani A, Teichberg VI, Farkas T

*Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion*

**European Journal of Pharmacology 2009 Feb 14;604(1-3):51-7**

(Impakt faktor:2.585)

**Rákos G**, Kis Z, Nagy D, Lür G, Farkas T, Hortobágyi T, Vécsei L, Toldi J

*Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain*

**Acta Neurobiologiae Experimentalis 2007;67(2):149-54**

(Impakt faktor:1.337)

Lür G, **Rákos G**, Juhász-Vedres G, Farkas T, Kis Z, Toldi J

*Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on the evoked cortical activity of controls and of brain-injured rats*

**Cellular and molecular neurobiology 2006 Oct-Nov;26(7-8):1505-19**

(Impakt faktor:2.107)

Marosi M, **Rákos G**, Robotka H, Németh H, Sas K, Kis Z, Farkas T, Lür G, Vécsei L, Toldi J

*Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischaemia*

**Journal of Neuroscience Methods 2006 Sep 30;156(1-2):231-5**

(Impakt faktor:2.295)



Juhász-Vedres G, Rózsa E, **Rákos G**, Dobszay MB, Kis Z, Wölflin J, Toldi J, Párducz A, Farkas T

*Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective when administered either before or after injury in a focal cortical cold lesion model*

**Endocrinology 2006 Feb, 147(2):683-6**

(Impakt faktor:4.752)

Kis Z, **Rákos G**, Farkas T, Horváth S, Toldi J

*Facial nerve injury induces facilitation of responses in both trigeminal and facial nuclei of rat*

**Neuroscience Letters 2004 Apr 1; 358(3):223-5**

(Impakt faktor:1.925)

## ABSZTRAKTOK

Marosi Máté, Fuzik János, Nagy Dávid, **Rákos Gabriella**, Kis Zsolt, Farkas Tamás, Toldi József

*Oxaloacetate is efficient in recovering ischaemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region*

IBRO International Workshop, 24-26 January 2008, Debrecen, Hungary

Marosi Máté, Fuzik János, Nagy Dávid, **Rákos Gabriella**, Kis Zsolt, Farkas Tamás, Vivian I. Teichberg, Toldi József

*Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion*

6<sup>th</sup> International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, 8-11 September 2008, Kassa, Szlovákia

Nagy Dávid, Marosi Máté, Kis Zsolt, Farkas Tamás, **Rákos Gabriella**, Vécsei László, Vivian I. Teichberg, Toldi József

*Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischaemia in rat cortex*

6<sup>th</sup> International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, 8-11 September 2008, Kassa, Szlovákia

**Rákos Gabriella**, Gellért Levente, Kis Zsolt, Farkas Tamás, Vivian I. Teichberg, Toldi József  
*Az oxálecetsav neuroprotektív hatása agykérgi fototrombotikus modellen*

Magyar Idegtudományi Társaság XI. Konferenciája, Szeged, 2007. január 24-27.

**Rákos Gabriella**, Lür György, Kis Zsolt, Farkas Tamás, Hortobágyi Tibor, Vécsei László, Toldi József

*A new method for rapid estimation of non-intact perilesional cells in focal brain injury: neuroprotection by dehydroepiandrosterone-sulfate*

IBRO International Workshop, 26-28 January 2006, Budapest, Hungary

Lür György, **Rákos Gabriella**, Marosi Máté, Nagy Dávid, Farkas Tamás, Kis Zsolt, Toldi József

*Effects of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) on the evoked cortical activity of controls and brain-injured rats*

IBRO International Workshop, 26-28 January 2006, Budapest, Hungary

Marosi Máté, **Rákos Gabriella**, Robotka Hermina, Németh Hajnalka, Sas Katalin, Nagy Dávid, Lür György, Kis Zsolt, Farkas Tamás, Vécsei László, Toldi József

*Fundamental differences in the acute but not in chronic ischemic tolerance of hippocampal CA1 region between Wistar rats from different vendors*

IBRO International Workshop, 26-28 January 2006, Budapest, Hungary

Robotka Hermina, Jozef Burda, Sas Katalin, Enikő Racekova, **Rákos Gabriella**, Kis Zsolt, Farkas Tamás, Marosi Máté, Vécsei László, Toldi József

*Neuroprotective effects of repeated transient global ischaemia induced by four-vessel occlusions on hippocampal CA1 neurons*

5<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience, 8-12 July 2006, Bécs, Ausztria

Marosi Máté, **Rákos Gabriella**, Robotka Hermina, Németh Hajnalka, Sas Katalin, Nagy Dávid, Lür György, Kis Zsolt, Farkas Tamás, Vécsei László, Toldi József

*Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischaemia*

5<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience, 8-12 July 2006, Bécs, Ausztria

Éva Rózsa, Gabriella Juhász-Vedres, Márton Dobszay, **Gabriella Rákos**, Zsolt Kis, Tamás Farkas, József Toldi

*Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a focal cortical cold lesion model*

Magyar Idegtudományi Társaság Konferenciája, Pécs, 2005. január 26-29.

**Rákos Gabriella**, Kis Zsolt, Farkas Tamás, Horváth Szatmár, Toldi József

*Facial nerve injury induces facilitation of responses in both trigeminal and facial nuclei of rat*

IBRO International Workshop, 29-31 January 2004, Budapest, Hungary

